

**KARDIOPROTEKTION DURCH INHIBITION DER
PHOSPHODIESTERASE 5 IN EINEM MODELL DER
BAKTERIENTOXIN-INDUZIERTEN SEPTISCHEN
KARDIOMYOPATHIE**

**LEONA FEE VALENTINE
VON SCHNAKENBURG**



INAUGURALDISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines **Doktors der Medizin**
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2011

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2011

© 2011 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

**Kardioprotektion durch Inhibition der Phosphodiesterase 5 in einem
Modell der Bakterientoxin-induzierten septischen Kardiomyopathie**

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Leona Fee Valentine von Schnakenburg

aus Gießen

Gießen 2010

Aus dem Zentrum für Innere Medizin
Medizinische Klinik V
Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH
Standort Gießen
Leiter: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. F. Grimminger

Gutachter: PD Dr. Grandel
Gutachter: Prof. Dr. Schlüter

Tag der Disputation: 14. Januar 2011

Meinen Eltern

Ingrid und Peter von Schnakenburg

Inhaltsverzeichnis

Liste verwendeter Abkürzungen	VII
Abbildungsverzeichnis	IX
1 Vorwort	1
2 Einleitung	2
2.1 Sepsis und septischer Schock	2
2.1.1 Definition	2
2.1.2 Klinik und Pathophysiologie	3
2.2 Kardiovaskuläre Veränderungen in der Sepsis	5
2.3 Die septische Kardiomyopathie	6
2.3.1 Klinische Merkmale der septischen Kardiomyopathie	6
2.3.2 Kardiodepressive Substanzen	7
2.3.3 Veränderungen der kardialen Mikrozirkulation	9
2.4 Vasoaktive Mediatoren	10
2.4.1 Stickstoffmonoxid (NO)	11
2.4.2 Arachidonsäuremetabolite	12
2.4.2.1 Thromboxan	14
2.4.2.2 Leukotriene	14
2.5 Bakterielle Pathogenitätsfaktoren in der Sepsis	15
2.5.1 Exotoxine	15
2.5.1.1 Staphylococcus aureus α -Toxin	16
2.5.2 Endotoxine und Endotoxinäquivalente	18
2.5.2.1 Lipoteichonsäuren (LTA)	19
2.6 Phosphodiesterasen (PDE)	21
2.6.1 Phosphodiesterase 5	22
2.6.2 Inhibitoren der Phosphodiesterase 5	23
2.6.3 Potentieller klinischer Einsatz von PDE-Inhibitoren	24
2.7 Fragestellung	25

3	Material und Methodik	26
3.1	Material	26
3.1.1	Versuchstiere	26
3.1.2	<i>Staphylococcus aureus</i> α -Toxin und Lipoteichonsäure	26
3.1.3	Pharmaka	26
3.1.4	Material und Geräte für die Organperfusion	27
3.1.5	Analytische Testkits	28
3.2	Methodik	29
3.2.1	Prinzip der Methode zur Perfusion isolierter Rattenherzen nach O. Langendorff	29
3.2.2	Versuchsaufbau	30
3.2.3	Entnahme und Präparation der Herzen	31
3.2.4	Perfusion der Herzen	32
3.2.5	Messung physiologischer Parameter am isolierten Rattenherzen	33
3.2.6	Standardversuchsprotokoll	34
3.2.7	Nachweis von Thromboxan A ₂ in Perfusatproben	35
3.2.8	Nachweis von TNF- α in Perfusatproben	36
3.2.9	Prüfung auf Kontamination der LTA mit Endotoxin	36
3.2.10	Auswertung und Statistik	37
4	Ergebnisse	38
4.1	Übersicht	38
4.2	Einfluss bakterieller Toxine auf die physiologischen Parameter isoliert perfundierter Rattenherzen	38
4.2.1	Parameter bei toxinfreier Perfusion	38
4.2.2	Wirkung von α -Toxin	39
4.2.3	Wirkung von LTA	41
4.3	Pharmakologische Intervention – Inhibition der PDE 5	43
4.3.1	Auswirkungen auf physiologische Parameter	43
4.3.1.1	PDE 5-Inhibition und α -Toxin	43
4.3.1.2	PDE 5-Inhibition und LTA	46

Inhaltsverzeichnis

4.4	Analyse der Perfusatproben auf vasoaktive Mediatoren	48
4.4.1	Modulation der Thromboxanfreisetzung	48
4.4.2	Modulation der TNF-Freisetzung	49
5	Diskussion	51
5.1	Entwicklung der Fragestellung	51
5.1.1	Pathophysiologische Veränderungen der septischen Kardiomyopathie	51
5.1.2	Bedeutung der bakteriellen Pathogenitätsfaktoren α -Toxin und LTA bei der Entstehung der Sepsis	53
5.2	<i>Staphylococcus aureus</i> α-Toxin und LTA rufen durch die Bildung von Entzündungsmediatoren eine Kardiodepression an isoliert perfundierten Rattenherzen hervor	54
5.3	PDE 5-Inhibitoren zeigen eine protektive Wirkung im Modell der α-Toxin- und LTA-induzierten Kardiodepression	56
5.4	Mögliche klinische Relevanz der Ergebnisse	58
6	Zusammenfassung	60
6.1	Zusammenfassung	60
6.2	Summary	61
7	Literaturverzeichnis	63
8	Erklärung	83
9	Danksagung	84
10	Lebenslauf	Fehler! Textmarke nicht definiert.

Liste verwendeter Abkürzungen

α -Tox	α -Toxin von <i>Staphylococcus aureus</i>
AchE	Acetylcholinesterase
Aqua dest.	Aqua destillata
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat (cyclic Adenosine monophosphate)
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat (cyclic Guanosine monophosphate)
cNOS	konstitutive NO-Synthetase
COX-1	konstitutionelle Cyclooxygenase
COX-2	induzierbare Cyclooxygenase
CPF	koronarer Perfusatfluss (coronary perfusion flow)
CPP	koronarer Perfusionsdruck (coronary perfusion pressure)
CYP 450	Cytochrom P450
Δ	Differenz
DMSO	Dimethylsulfoxid
dP/dt _{max}	maximale linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit
ECH	<i>Escherichia coli</i> Hämolysin
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
Einw.	Einwohner
ET	Endothelin
HETE	Hydroxy-Eicosatetraensäuren
HR	Herzfrequenz (heart rate)
HZV	Herzzeitvolumen
IL-1 β	Interleukin-1 β
iNOS	induzierbare NO-Synthetase

Liste verwendeter Abkürzungen

LPS	Lipopolysaccharid
LT	Leukotrien
LTA	Lipoteichonsäure (Lipoteichoic acid)
LVDP	linksventrikulärer entwickelter Druck (left ventricular developed pressure)
LVP	linksventrikulärer Druck (left ventricular pressure)
LW1 bzw. 2	Leerwert 1 bzw. Leerwert 2
MDS	Myocardial depressent substances
MOV	Multiorganversagen
MODS	Multi organ dysfunction syndrome
MOF	Multi organ failure
NaHCO ₃	Natriumhydrogenkarbonat
NO	Stickstoffmonoxid
PAF	Plättchen aktivierender Faktor
PDE	Phosphodiesterase
PDE 5	Phosphodiesterase 5
PG	Prostaglandin
PGI ₂	Prostacyclin
PKG	Proteinkinase G
SIRS	Systemic inflammatory response syndrome
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor- α
TxA ₂	Thromboxan A ₂
TxB ₂	Thromboxan B ₂

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2-1:	Pathogenese der Sepsis	5
Abbildung 2-2:	Arachidonsäurestoffwechsel	13
Abbildung 2-3:	Porenbildung durch <i>Staphylococcus aureus</i> α -Toxin	18
Abbildung 2-4:	Lipoteichonsäuren sind Bestandteile der Zellwand grampositiver Bakterien	20
Abbildung 3-1:	Prinzip der Organperfusion nach O. Langendorff	29
Abbildung 3-2:	Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Perfusion isolierter Organe nach O. LANGENDORFF.	31
Abbildung 4-1:	Physiologische Parameter isoliert perfundierter Rattenherzen über 180 Minuten bei toxinfreier Perfusion (Absolutwerte)	39
Abbildung 4-2:	Auswirkungen von α -Toxin auf die Perfusion und Kontraktilität isoliert perfundierter Rattenherzen	40
Abbildung 4-3:	Auswirkungen von LTA auf die Perfusion und Kontraktilität isoliert perfundierter Rattenherzen	42
Abbildung 4-4:	Auswirkungen der PDE 5-Inhibition auf physiologische Parameter α -Toxin-perfundierter Rattenherzen	45
Abbildung 4-5:	Auswirkungen der PDE 5-Inhibition auf physiologische Parameter LTA-perfundierter Rattenherzen	47
Abbildung 4-6:	Freisetzung von Thromboxan nach Applikation von α -Toxin mit und ohne PDE-Inhibition im Vergleich zur toxinfrei perfundierten Kontrollgruppe	48
Abbildung 4-7:	Freisetzung von TNF- α nach Applikation von α -Toxin mit und ohne PDE-Inhibition im Vergleich zur toxinfrei perfundierten Kontrollgruppe	49

1 Vorwort

Der experimentelle Teil der vorliegenden Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 2003 bis März 2006 im Laborbereich von Herrn Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. F. Grimminger am Zentrum für Innere Medizin, Medizinische Klinik V der Justus-Liebig-Universität Gießen, in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. med. U. Sibelius durchgeführt. Die Betreuung erfolgte durch Herrn PD Dr. med. U. Grandel.

Den klinischen Hintergrund der vorliegenden Arbeit bildet das Krankheitsbild der septischen Kardiomyopathie, welches eine schwere Komplikation der Sepsis und des septischen Schocks darstellt. Die zentrale Fragestellung war, inwieweit die aktivierte Phosphodiesterase 5 an der Pathogenese der septischen Kardiomyopathie beteiligt ist. Da die Freisetzung von Bakterientoxinen klinisch relevanter Sepsiserreger maßgeblich zur Pathogenese der septischen Kardiomyopathie beiträgt, wurde ein der septischen Kardiomyopathie ähnliches Krankheitsbild am Modell des isolierten Rattenherzens durch koronare Perfusion isolierter Bakterientoxine von *Staphylococcus aureus* hervorgerufen. Um die pathophysiologische Relevanz der Phosphodiesterase 5 (PDE 5) zu evaluieren, wurden spezifische Inhibitoren der PDE 5 in diesem Modell der toxinaktivierten kardialen Dysfunktion eingesetzt. Von besonderem Interesse war hierbei neben den Veränderungen der Herzfunktion die Modulation der toxinaktivierten Mediatorfreisetzung. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen darauf hin, dass die Inhibition der PDE 5 einen kardioprotektiven Effekt im Modell der grampositiven septischen Kardiomyopathie ausüben könnte.

2 Einleitung

2.1 Sepsis und septischer Schock

Die Sepsis und ihre Komplikationen stellen eine große Herausforderung der modernen Intensivmedizin dar. Die Mortalität der Sepsis liegt zwischen 25 und 80 % [1] und bleibt trotz optimierter antibiotischer und supportiver Therapiemöglichkeiten unverändert hoch. In den Vereinigten Staaten von Amerika war die Sepsis 2002 die häufigste Todesursache schwerstkranker Patienten [2]. Wie eine im Frühjahr 2007 veröffentlichte Beobachtungsstudie des öffentlich geförderten Kompetenznetzes Sepsis (SepNet) zeigte, ist in Deutschland jährlich mit 79.000 Fällen von Sepsis (116/100 000 Einwohner) und mit etwa 75.000 (110/100 000 Einwohner) Fällen schwerer Sepsis und septischen Schocks zu rechnen [3].

2.1.1 Definition

Die im Folgenden angegebenen Definitionen stützen sich auf Daten des American College of Chest Physicians und der Society of Critical Care Medicine Consensus Conference aus dem Jahre 1991 [4].

Um die Diagnose "Systemic inflammatory response syndrome" (SIRS) stellen zu können, müssen mindestens zwei der folgenden Kriterien erfüllt sein:

- Körpertemperatur < 36 oder > 38 °C
- Tachykardie mit einer Frequenz von ≥ 90 Schlägen pro Minute
- Tachypnoe mit einer Atemfrequenz ≥ 20 pro Minute und/oder einem $p_a\text{CO}_2 \leq 33$ mmHg oder künstlicher Beatmung
- Leukozytenwerte $< 4000/\mu\text{l}$ oder $> 12\,000/\mu\text{l}$ oder eine Linksverschiebung ≥ 10 %

Als Sepsis gilt ein SIRS infolge einer Infektion, welche klinisch oder mikrobiologisch gesichert ist.

2 Einleitung

Eine schwere Sepsis ist eine Sepsis in Verbindung mit mindestens einer Organdysfunktion (z.B. Nierenversagen).

Als septischen Schock bezeichnet man jede Sepsis oder schwere Sepsis mit persistierender Hypotension trotz adäquater Volumensubstitution oder der Erfordernis einer Verabreichung von Vasopressoren (wie z.B. Noradrenalin), um einen mittleren arteriellen Blutdruck von 70 mmHg zu erhalten.

Zu den oben erwähnten Organdysfunktionen zählt man die nachfolgend erwähnten:

- Hämatologische Störungen: Thrombozytenwerte $\leq 100\ 000/\mu\text{l}$ oder ein Abfall von $>30\ \%$ innerhalb von 24 h ohne Hämorrhagie
- Kardiovaskuläre Dysfunktion mit einem systolischen Blutdruck $\leq 90\ \text{mmHg}$ über mindestens eine Stunde bei zuvor normotonen Patienten oder ein anhaltender Abfall des Blutdrucks von $\geq 40\ \text{mmHg}$ vom Ausgangswert
- Respiratorische Dysfunktion mit einem $p_a\text{O}_2/\text{FiO}_2 \leq 250\ \text{mmHg}$, nicht durch eine manifeste pulmonale oder kardiale Krankheit verursacht
- Renale Dysfunktion mit einer Urinausscheidung $\leq 0,5\ \text{ml/kg/h}$ für mindestens eine Stunde trotz Flüssigkeitsausgleich oder einem Kreatininanstieg im Serum auf mindestens das Doppelte des Ausgangswertes
- Metabolische Azidose mit einem $\text{pH} \leq 7,30$ oder einem "base excess" $\geq 5,0\ \text{mmol/l}$ oder einer 1,5-fach erhöhten Laktatkonzentration
- Akute Enzephalopathie mit Unruhe, Desorientiertheit, verminderter Vigilanz, Desorientiertheit oder Delirium ohne Einwirkung psychotroper Substanzen

2.1.2 Klinik und Pathophysiologie

Die klinische Diagnose der Sepsis stützt sich auf das Vorhandensein eines SIRS mit dem klinischen oder mikrobiologischen Nachweis einer Infektion. Bereits im Jahre 1914 wurde von Schottmüller Folgendes zur Sepsis definiert: „... eine Sepsis liegt dann vor, wenn sich innerhalb des Körpers ein Herd gebildet hat, von dem aus konstant oder periodisch pathogene Bakterien in den Blutkreislauf gelangen, derart, dass durch diese Invasion subjektive oder

objektive Krankheitserscheinungen ausgelöst werden“ [5]. Diese Definition ist auch heute noch im Wesentlichen geläufig.

Für die Pathogenese des Krankheitsbildes Sepsis ist vor allem die Immunantwort des Organismus auf die Infektion von großer Bedeutung. Vom Infektionsherd aus werden die Erreger selbst (Bakterien, Viren, Pilze, Parasiten) oder ihre Pathogenitätsfaktoren in den Organismus ausgeschwemmt. Zu den bakteriellen Pathogenitätsfaktoren zählen unter anderem bakterielle Exotoxine, wie das α -Toxin (α -Tox) des Bakteriums *Staphylococcus aureus*, oder auch Endotoxine wie Lipopolysaccharide (LPS) gramnegativer Erreger bzw. Endotoxinäquivalente wie Lipoteichonsäuren (LTA) grampositiver Erreger. Bakterientoxine rufen über die Aktivierung körpereigener humoraler und zellulärer Effektorsysteme die Ausschüttung verschiedener Entzündungsmediatoren und Zytokine wie Tumor Nekrose Faktor- α (TNF- α) oder Interleukin-1 β (IL-1 β) hervor und induzieren so eine systemische Entzündungsreaktion [6]. Diese umfasst die Aktivierung von Komplement- und Gerinnungssystem, von Thrombozyten und neutrophilen Granulozyten sowie von Endothelzellen und mononukleären Zellen in Blut und Gewebe. Diese reagieren ihrerseits mit der Freisetzung weiterer inflammatorischer und vasoaktiver Mediatoren, wie dem Plättchen aktivierenden Faktor (PAF), Stickstoffmonoxid (NO) und verschiedenen Arachidonsäuremetaboliten. Im gesamten Organismus kommt es durch die Wirkung dieser Mediatoren zu einer Beeinträchtigung der Makro- und Mikrozirkulation, was schwere lokale Gewebeschädigungen zur Folge hat. Diese Kaskade endet schließlich entweder in einer isolierten Schädigung von Organen, wobei vor allem Lunge, Nieren, Darm, Leber und Herz gefährdet sind, oder in einem Multiorganversagen mit septischem Schock [7][8]. Ein Multiorganversagen (MOV; auch: MODS: Multi organ dysfunction syndrome; MOF: Multi organ failure) wird dabei definiert als schwere Funktionseinschränkung oder Versagen verschiedener lebenswichtiger Organe des Körpers.

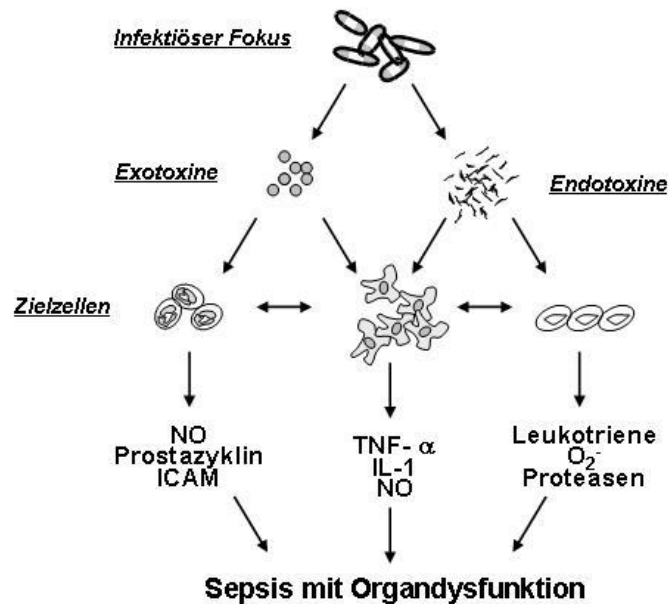


Abbildung 2-1: Pathogenese der Sepsis

Durch die Einschwemmung bakterieller Exo- und Endotoxine in den systemischen Kreislauf kommt es über eine Aktivierung toxinsensibler Zielzellen (z.B. Endothelzellen, neutrophile Granulozyten, monozytäre Zellen) zu einer Freisetzung von Entzündungsmediatoren, welche zur klinischen Manifestation der Symptome der Sepsis führen.

2.2 Kardiovaskuläre Veränderungen in der Sepsis

Der septische Schock ist zu Beginn durch eine frühe hyperdynamie bzw. hyperzirkulatorische Phase gekennzeichnet, in der es durch eine Vasodilatation zu einem Abfall des peripheren Gefäßwiderstandes kommt [9]. Bei ausreichender Volumensubstitution und Erhöhung des Herzzeitvolumens (HZV) kann der Blutdruck bis zu einem gewissen Grad kompensatorisch aufrechterhalten werden. Klinisch zeigt sich bei diesen Patienten als Ausdruck der systemischen Vasodilatation eine Erwärmung der Haut. Fällt der systolische Blutdruck schließlich unter 90mmHg bzw. um mehr als 40mmHg des Ausgangswertes ab, so spricht man vom septischen Schock [10]. Dieser verläuft fast immer hyperdynam, d.h. der Blutdruck ist zwar erniedrigt, das HZV bei adäquater Volumensubstitution aber trotzdem erhöht [11]. Es kann jedoch auch zu einem Übergang in eine hypodynamie bzw. hypozirkulatorische Verlaufsform kommen, welche pathophysiologisch durch einen ansteigenden Gefäßwiderstand und ein fallendes HZV gekennzeichnet ist und sich klinisch durch eine

kühle Haut bemerkbar macht. Diese Verlaufsform ist dem kardiogenen oder hypovolämischen Schock ähnlich [12].

Aufgrund der Tatsache, dass das HZV in der Sepsis häufig erhöht ist, ging man lange davon aus, dass das Myokard von der Sepsis nahezu unbeeinträchtigt bleibt. Dabei wurde jedoch außer Acht gelassen, dass der Blutdruckabfall durch das erhöhte HZV oft nur unzureichend ausgeglichen werden kann. Wie inzwischen anhand von Tierexperimenten sowie in klinischen Untersuchungen gezeigt werden konnte, ist auch die Herzfunktion in der Sepsis beeinträchtigt. Bis zu 14 % der Todesfälle im septischen Schock sind auf ein Pumpversagen des Herzens zurückzuführen [8]. Diese Insuffizienz des Herzens in der Sepsis und im septischen Schock wird heute als *septische Kardiomyopathie* bezeichnet. Der Begriff wurde erstmals von H. P. Schuster für dieses Krankheitsbild vorgeschlagen [13].

2.3 Die septische Kardiomyopathie

2.3.1 Klinische Merkmale der septischen Kardiomyopathie

Mit Hilfe von Radionukliduntersuchungen und Thermodilutionsmethoden konnte die kardiale Dysfunktion bei Patienten mit septischem Schockgeschehen nachgewiesen und analysiert werden. Bei vielen Patienten kommt es in der Sepsis als Zeichen der kardialen Schädigung zu einer linksventrikulären enddiastolischen Dilatation. Trotz Reduktion der Auswurffraktion bleibt dadurch das Schlagvolumen häufig unverändert. Bei abfallendem peripherem Widerstand kann durch Zunahme der Herzfrequenz das Herzzeitvolumen als Ausdruck der Hyperzirkulation gesteigert sein. [14]. Für den rechten Ventrikel konnten gleiche Muster der Herzarbeit nachgewiesen werden [15]. Zusätzlich können auch bei zuvor herzgesunden Patienten segmentale oder globale Hypokinesien des Ventrikelmyokards auftreten [16]. Außerdem weisen Patienten in der Sepsis gestörte Volumen-Druck-Beziehungen der Ventrikel auf, die durch eine erhöhte Compliance des Myokards gekennzeichnet sind. Die Compliance, als Maß für die Dehnbarkeit eines Systems, errechnet sich aus der Volumenänderung in Relation zur Druckänderung. Infolge dieser Complianceveränderung kann durch die obligatorische Volumensubstitutionstherapie während der Sepsis zwar der pulmonalkapilläre Verschlussdruck angehoben, nicht jedoch die Herzleistung adäquat

verbessert werden [17]. Zudem ist in der Sepsis die koronare Zirkulation verändert. Es kommt zu einer koronaren Vasodilatation mit gesteigertem koronaren Blutfluss, bei gleichzeitig verminderter Sauerstoffextraktion [18][19]. Dies schließt zwar Perfusionsstörungen auf Ebene der Makrozirkulation aus, ist aber ein typischer Befund für septische Mikrozirkulationsstörungen mit möglicherweise fokalen Hypoxien. All diese Veränderungen sind nach Rückbildung der Sepsis vollständig reversibel. In tierexperimentellen Untersuchungen konnten die pathophysiologischen Charakteristika der septischen Kardiomyopathie nachvollzogen werden. An mit *Escherichia coli* infizierten Hunden wurde ein septisches Krankheitsbild mit hyperzirkulatorischer Kreislauftsituation beobachtet, und in einem anderen hyperzirkulatorischen Sepsismodell an Hunden konnte eine sepsisassoziierte Abnahme der Kontraktilität des Myokards nachgewiesen werden [20][21][22]. *In vitro* gelang es, an isolierten Herzen septischer Ratten, sowohl für frühe als auch für spätere Krankheitsstadien der Sepsis, eine deutliche Verminderung der Kontraktilität nachzuweisen [23][24]. Zahlreiche nachfolgende Untersuchungen konnten diese Ergebnisse bestätigen [25][26].

Verschiedene Pathomechanismen scheinen für diese, sowohl klinisch als auch tierexperimentell nachvollziehbaren Veränderungen der septischen Kardiomyopathie verantwortlich zu sein. Zentrale Bedeutung scheint hierbei so genannten kardiodepressiven Substanzen zuzukommen, deren Spiegel in der Sepsis erhöht sind. Zudem könnten Mikrozirkulationsstörungen, die in der Sepsis in nahezu allen Organen auftreten, im Herzen zu einer Beeinträchtigung der Pumpfunktion führen.

2.3.2 Kardiodepressive Substanzen

Das Auftreten so genannter kardiodepressiver Substanzen in der Sepsis scheint an der Entstehung der septischen Kardiomyopathie ursächlich mitbeteiligt zu sein. Wie heute bekannt ist, handelt es sich dabei vor allem um die Zytokine TNF- α und IL-1 β . Bereits im Jahre 1947 wurde die Anwesenheit zirkulierender kardiodepressiver Substanzen im hämorrhagischen Schock postuliert [27], später konnten solche Substanzen dann auch im Tiermodell des hypozirkulatorischen Endotoxinschocks isoliert werden [28]. Im Jahre 1985 ist schließlich durch Parrillo et al. der Nachweis kardiodepressiver Substanzen im Serum septischer Patienten gelungen. Die Seren septischer Patienten zeigten *in vivo* im Vergleich zu

denen einer Kontrollgruppe gesunder Probanden sowie einer Gruppe chronisch Herzkranker und denen intensivmedizinisch betreuter, nicht-septischer Patienten, eine eindeutig negativ inotrope Wirkung auf isolierte Herzmuskelzellen. Diese Wirkung konnte durch Seren dieser Sepsispatienten, welche vor der Erkrankung, bzw. nach der Genesung gewonnen worden waren, nicht mehr nachgewiesen werden. Hieraus konnte auf das Vorhandensein so genannter „Myocardial depressant substances“ (MDS) während des septischen Schocks geschlossen werden [29]. Zu diesem Zeitpunkt war jedoch noch nicht bekannt, welche Substanzen für diese kardiodepressive Wirkung verantwortlich waren. In der Diskussion standen neben Zytokinen u.a. Prostaglandine, Leukotriene, PAF, Histamin und auch Endorphine [30]. Aufgrund ähnlicher biochemischer Merkmale sowie seiner negativ inotropen Wirkung auf isolierte Kardiomyozyten von Ratten kam TNF- α als eine der kardiodepressiven Substanzen der Sepsis in Frage [31]. Später zeigten Kumar et al. (1996), dass die kardiodepressive Potenz von Seren, welche Patienten mit stark beeinträchtigter Herzfunktion im septischen Schock entnommen wurden, mit der Konzentration an TNF- α und IL-1 β in diesen Proben korrelierte. Dieser kardiodepressive Effekt ließ sich *in vivo* durch Immunabsorption dieser beiden Zytokine aus den septischen Schockseren aufheben [32].

Außerdem konnte an isolierten Kardiomyozyten von Ratten gezeigt werden, dass diese beiden Zytokine sogar synergistisch wirken können. Um die Kontraktilität der Zellen einzuschränken, benötigt man höhere Konzentrationen der Einzelsubstanz TNF- α oder IL-1 β , als bei Kombination beider Zytokine [32]. Das Gleiche gilt für menschliches Myokard [33].

Die molekularen Mechanismen der durch Zytokine ausgelösten Kardiodepression sind mittlerweile vor allem für TNF- α gut charakterisiert. Zytokine lösen innerhalb weniger Minuten eine Kardiodepression aus, die allerdings über Stunden anhalten kann. *In vitro* kommt es nach Applikation von TNF- α oder IL-1 β an isolierten Kardiomyozyten bereits nach 10 Minuten zum Rückgang der Kontraktilität. Die Geschwindigkeit dieser Reaktion lässt auf molekularer Ebene die Aktivierung präformierter Signaltransduktionswege vermuten und schließt die Induktion weiterer Effektorproteine, d.h. die *de-novo*-Synthese von Proteinen, faktisch aus. So konnte gezeigt werden, dass TNF- α im experimentellen System durch Aktivierung der Kalzium/Calmodulin-abhängigen konstitutiven NO-Synthetase (cNOS) mit Bildung von NO und zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) zur Kardiodepression führt. Als weiterer molekularer Mechanismus konnte die Aktivierung des Sphingomyelinase-

Wegs mit Bildung von Sphingosin identifiziert werden [34][35][36]. Beiden Mechanismen ist gemein, dass sie letztlich zur Störung des intrazellulären Kalziumstoffwechsels der Kardiomyozyten und somit zur Störung der Kontraktilität führen [34][37].

Der über Stunden anhaltende kardiodepressive Effekt muss angesichts der relativ kurzen Halbwertszeit von TNF- α allerdings durch andere Mechanismen hervorgerufen werden. Hier kommt es durch die Wirkung der Zytokine zu einer de-novo Synthese des iNOS-Proteins, was eine unphysiologische und exzessive Bildung kardiodepressiv wirkenden NOs nach sich zieht [38] [39]. Auf die Biologie von NO und seinem intrazellulären Second Messenger cGMP wird in Kapitel 2.3.3 noch ausführlich eingegangen.

Obwohl die Zytokine eine bedeutende Rolle in der Pathogenese der septischen Kardiomyopathie zu spielen scheinen, konnten „Anti-Zytokin-Strategien“ klinisch nicht überzeugen [40][41]. So konnte die Gabe von monoklonalen Anti-TNF- α -Antikörpern an Patienten im septischen Schock die Kardiodepression zwar vermindern, leider die Mortalität jedoch nicht verbessern. Auch die Gabe von IL-1 β -Antagonisten wirkte sich positiv auf den hämodynamischen Verlauf des septischen Schocks aus, ohne jedoch die Mortalität zu verringern. Somit ist davon auszugehen, dass weitere bedeutende Pathomechanismen an der Entstehung der septischen Herzschiidigung beteiligt sein müssen [40][41]. Einen zusiitzlichen Pathomechanismus der septischen Kardiomyopathie k6nnten kardiale Mikrozirkulationsst6rungen darstellen.

2.3.3 Veriinderungen der kardialen Mikrozirkulation

Die zu Beginn der Erforschung des septischen Krankheitsbildes aufgestellte Hypothese, dass die kardiale Schiidiigung wiihrend der Sepsis Folge einer globalen Minderperfusion des Myokards sei, wurde bereits wiihrend der 80er Jahre durch Cunnion [18] und Dainhaut [19] widerlegt. Sie wiesen bei Patienten im septischen Schock einen normalen bis gesteigerten koronaren Blutfluss nach, bei erniedrigtem GefiiBwiderstand und verminderter myokardialer Sauerstoffextraktion. Eine St6rung der Herzperfusion auf Ebene der Mikrozirkulation, wie sie in der Sepsis in vielen Organen (z.B. Lunge [42], Darm [43], Leber [44] oder Skelettmuskel [45]) auftritt, konnte jedoch nicht ausgeschlossen werden. Ursache einer solchen Mikrozirkulationsst6rung kann beispielsweise eine Shuntperfusion sein. Bei priiformierten

Shunts fließt das Blut direkt von der Arteriole in die Venole und umgeht die Kapillarstrombahn, was eine verminderte Oxygenierung des Gewebes zur Folge hat. Solche Gefäßkurzschlüsse konnten mit Hilfe tierexperimenteller Untersuchungen an septischen Kaninchen beispielsweise für die Skelettmuskulatur nachgewiesen werden [46]. Zudem könnte es auch zu einer funktionellen Shunt-Perfusion kommen, die durch ein Nebeneinander minderperfundierter und nicht bedarfsgerecht überperfundierter Kapilleraschnitte gekennzeichnet ist. In anderen tierexperimentellen Untersuchungen an Hunden im Endotoxinschock konnte mit Hilfe radioaktiv markierter Mikrosphären die Durchblutung des Herzens untersucht werden. Hierbei zeigte sich eine gestörte Pumpfunktion bei normalem myokardialen Blutfluss, mit jedoch heterogener Verteilung in den Gefäßen und einem Nebeneinander von über- und minderperfundierten Arealen. Als Ursache hierfür wurde eine Störung der Gefäßregulation angesehen, die Pumpschwäche wurde auf fokale Ischämien infolge der Minderperfusion zurückgeführt [47]. Auch das Auftreten erhöhter Troponin I-Werte in der Sepsis spricht für eine Minderperfusion von Herzarealen mit anschließender Gewebeschädigung [48]. Mit Hilfe des Ganztiermodells wurde gezeigt, dass es in der Sepsis zu einer Störung der Koronarreserve kommt. Im Gegensatz zur gesunden Kontrollgruppe war es septischen Schafen nicht möglich, durch eine Erhöhung des koronaren Blutflusses und der Sauerstoffextraktion adäquat auf eine Hypoxie zu reagieren, was auf eine gestörte koronare Vasomotorik hinweist [49]. Am Myokard endotoxinämischer Ratten konnte eine Anfälligkeit für fokale Ischämien nachgewiesen werden, trotz gesteigerter Aktivität der induzierbaren NO-Synthetase mit gesteigerter Perfusion [50]. Es wird diskutiert, dass die unkontrollierte systemische und auch kardiale Freisetzung vasoaktiver Mediatoren, wie beispielsweise des NO oder der Arachidonsäuremetabolite, eine pathogenetische Schlüsselrolle bei der Entstehung dieser mikrozirkulatorischen Perfusionsstörungen spielt [51][52]. Auf diese vasoaktiven Mediatoren wird im nächsten Kapitel näher eingegangen.

2.4 Vasoaktive Mediatoren

Bei der Entstehung kardialer Mikrozirkulationsstörungen könnte auch die unphysiologische Bildung vasoaktiver Mediatoren von großer Bedeutung sein. Zu diesen Mediatoren zählt neben dem Endothelin, dem Plättchen-aktivierenden Faktor und den Lipoxigenaseprodukten

vor allem das Cyclooxygenaseprodukt Thromboxan A₂ (TxA₂) sowie NO. Auf NO und TxA₂ wird im Folgenden näher eingegangen.

2.4.1 Stickstoffmonoxid (NO)

Unter physiologischen Bedingungen gehört NO zu den wichtigsten Regulatoren des Gefäßtonus. Es wird in Endothelzellen über eine endotheliale Kalzium/Calmodulin-abhängige konstitutive NO-Synthetase (cNOS) aus der Aminosäure L-Arginin gebildet und induziert eine Vasorelaxation. Diese NO-gesteuerte Regulation des Ruhetonus findet im gesamten Organismus, also auch in Gefäßen des Herzens, statt [53][54]. NO hat mit 6 bis 10 Sekunden nur eine sehr kurze Halbwertszeit. Es ist ein freies, leicht diffundierendes Molekül und führt in benachbarten glatten Muskelzellen zur Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase, woraufhin diese cGMP produziert. Das cGMP aktiviert eine cGMP-abhängige Proteinkinase, über welche die Wiederaufnahme von Ca²⁺ durch Phospholamban in das sarkoplasmatische Retikulum der Gefäßmuskelzelle, als molekulare Grundlage der Vasodilatation, angeregt wird [55][56]. Eine verminderte endotheliale NO-Freisetzung scheint bei der Pathogenese der essentiellen Hypertonie und der Atherosklerose von Bedeutung zu sein [57]. Interessant ist, dass neben den glatten Gefäßmuskelzellen auch die Kontraktilität von Herzmuskelzellen unter physiologischen Bedingungen durch NO beeinflusst wird. Dies konnte in tierexperimentellen Studien mit Hunden sowie anhand isolierter Herzmuskelzellen nachgewiesen werden [58][59]. Bei Kardiomyozyten führt eine Zugabe gelösten NOs oder eines NO-Donors, wie dem Natriumnitroprussid, zu einer Verminderung der Kontraktilität [60].

Wie in experimentellen und klinischen Untersuchungen gezeigt werden konnte, wird NO unter pathophysiologischen Bedingungen zunehmend von einer induzierbaren NO-Synthetase (iNOS) in Endothel- und glatten Muskelzellen sowie auch in Herzmuskelzellen gebildet. Diese iNOS wird durch die Einwirkung von Zytokinen und Endotoxinen auf ihre Zielzellen nach Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren de-novo synthetisiert. Diese Induktion der iNOS wird für die exzessive NO-Freisetzung in der Sepsis verantwortlich gemacht [53][60][61][62]. Stickstoffmonoxid selbst hat eine geringe Halbwertszeit und ist deshalb nur schwer nachweisbar. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass seine Oxidationsprodukte Nitrit und Nitrat während eines Endotoxinschocks bei Ratten und auch in humanem septischen Schockserum erhöht sind [63][64]. Der zugrundeliegende Mechanismus der NO-vermittelten

exzessiven Vasodilatation und Kardiodepression in der Sepsis wird sehr wahrscheinlich, wie unter physiologischen Bedingungen auch, durch die Bildung von cGMP vermittelt. Es konnten erhöhte cGMP-Spiegel während des Endotoxinschocks bei Nagetieren [65][66] und auch während des septischen Schocks beim Menschen festgestellt werden [67]. Zwischen cGMP-Spiegel und systemischem Gefäßwiderstand war ebenfalls ein Zusammenhang zu beobachten. Aufgrund der Tatsache, dass die myokardiale Depression durch erhöhte Spiegel von NO schon binnen sehr kurzer Zeit beobachtet werden kann, die Expression der iNOS nach TNF- α -Stimulation jedoch mehrere Stunden dauert, kommt die Vermutung auf, dass auch die cNOS, zumindest während der frühen Phase der Entstehung der septischen Kardiomyopathie, von Bedeutung sein könnte [35][68][69].

2.4.2 Arachidonsäuremetabolite

Die vierfach ungesättigte Arachidonsäure (Eicosatetraensäure, AA) ist die Ausgangssubstanz für die Bildung von Eicosanoiden. Zu ihnen zählen die Prostaglandine, Prostacycline, Thromboxane, Leukotriene und Epoxyeicosanoide. Die Phospholipase A₂ spaltet AA aus Membranphospholipiden. Über verschiedene enzymatische Schritte entstehen unterschiedliche Eicosanoide.

Katalysiert durch die Cyclooxygenase, durch eine Bis-Dioxygenierung der AA über Prostaglandin G₂ zu Prostaglandin H₂ und nachfolgender Einwirkung unterschiedlicher Isomerasen, Reduktasen und Synthasen, entstehen die Endprodukte Prostazyklin (PGI₂) und Thromboxan (Tx)A₂ sowie weitere Prostaglandine (PGD₂, PGE₂, PGF_{2a}). Derzeit sind zwei verschiedene Isoformen der Cyclooxygenase bekannt: die konstitutionelle Cyclooxygenase (COX-1), welche in fast allen Geweben vorhanden ist und auf physiologische Stimuli reagiert und die induzierbare Cyclooxygenase (COX-2), welche meist durch spezielle Stimuli wie Inflammation, Ischämie oder Sepsis induziert wird. Unter anderem wurde die COX-2 in Herzmuskelgewebe nachgewiesen [70][71][72].

Die AA kann jedoch auch durch verschiedene Lipxygenasen umgesetzt werden. Diese sorgen für eine Dioxygenierung der AA, wodurch die instabilen Hydroperoxy-Eicosatetranoide (HPETE) entstehen, die wiederum von Hydroxyperoxydasen zu den biologisch aktiven Hydroxyeicosatetraensäuren umgesetzt werden. Aus diesem Substrat kann

2 Einleitung

durch Dehydrierung als weiteres Zwischenprodukt das Leukotrien (LT) A_4 entsteht, welches durch Konjugation mit Glutathion zu den Cysteinyl-Leukotrienen LTC_4 , LTD_4 und LTE_4 umgesetzt werden kann oder spontan hydrolysiert und somit inaktiviert wird.

Wie aus Abbildung 2-2 ersichtlich ist, kann die AA über einen dritten Stoffwechselweg, den Cytochrom P450 (CYP 450) abhängigen Metabolismus, umgesetzt werden. Hierbei kommt es zu einer Hydroxylierung, Epoxidation oder allylischen Oxidation der AA. Durch eine Hydroxylierung der AA entstehen verschiedene Hydroxy-Eicosatetraensäuren (HETEs). Läuft der Stoffwechselweg über Epoxygenasen, werden die Doppelbindungen der AA durch den aktivierten Sauerstoff angegriffen und es entstehen Epoxy-Eicosatriensäuren. Bei der allylischen Oxydation katalysieren die CYP-Enzyme einen den der Lipoxygenasen ähnlichen Reaktionstyp. Auch hierbei entstehen HETEs [73][74].

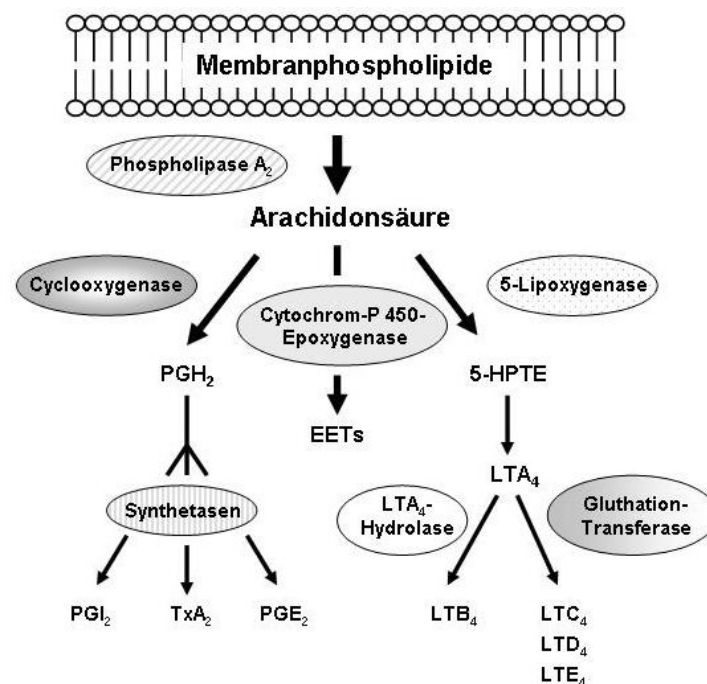


Abbildung 2-2: Arachidonsäurestoffwechsel

Das Enzym Phospholipase A_2 setzt Arachidonsäure aus Lipiden biologischer Membranen frei. Durch die Cyclooxygenase und verschiedene Synthetasen entstehen Prostaglandine und Thromboxane. Die Cytochrom-P450-Epoxygenase katalysiert die Bildung von Epoxyeicosanoiden, bei Oxidation der Arachidonsäure durch die Lipoxygenase entstehen über die Hydroxy-Eicosatetraensäure und das Leukotrien A_4 die verschiedenen Leukotriene.

2.4.2.1 Thromboxan

Während Prostacyclin der Thrombozytenaggregation entgegenwirkt und für eine Gefäßerweiterung mit verminderter Permeabilität sorgt, wirkt Thromboxan aggregationsfördernd auf Thrombozyten, bronchokonstriktorisches in der Lunge sowie vasokonstriktorisches, vor allem in koronaren und pulmonalen Gefäßen [75][76][77][78]. Bernard et al. (1991) konnten zeigen, dass in der Sepsis die Prostanoidspiegel im Plasma erhöht sind, und dass die Höhe der Spiegel in direktem Zusammenhang mit der Schwere des Krankheitsverlaufes steht. Das PGI₂ hingegen scheint, vermutlich über seine vasodilatativen Eigenschaften, einen schützenden Effekt zu haben [79]. Bereits 1991 wurde belegt, dass Funktionsstörungen des Herzens, ausgelöst durch eine Bakteriämie, durch eine Synthesehemmung von Thromboxan abgeschwächt werden können [80]. Am isolierten Rattenherzen konnte ein Zusammenhang zwischen Thromboxan-vermittelter koronarer Vasokonstriktion und myokardialer Depression infolge koronarer Perfusion des Bakterientoxins *Staphylococcus aureus* α -Toxin gezeigt werden [76]. Interessant ist auch, dass Lipoteichonsäuren von *Staphylococcus aureus* zu einer Induktion der COX-2 in isolierten Rattenherzen führen. Durch die COX-2 kommt es zu einer verstärkten Bildung von TxA₂, welches dann die Freisetzung des kardiodepressiven TNF- α fördert. Über eine Hemmung der Cyclooxygenasen mit selektiven COX-2-Inhibitoren oder den Einsatz von TxA₂-Rezeptorantagonisten kann die Freisetzung von TNF- α und die assoziierte Kardiodepression abgeschwächt werden [36].

2.4.2.2 Leukotriene

Den Leukotrienen wird eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie der Sepsis und des SIRS zugeschrieben [81]. Vor allem LTB₄ ist ein potentes Chemotaxin, während die Cysteinylleukotriene LTC₄, D₄ und E₄ für eine Kontraktion glatter Muskelzellen an Bronchien und Gefäßen sorgen [82][83]. Wegen der vor allem postkapillär starken Vasokonstriktion fördern sie die Plasmaexsudation und Ödembildung [84][85]. In experimentellen Untersuchungen an isolierten Hasenherzen konnte die Vasokonstriktion durch Leukotriene auch für Koronargefäße nachgewiesen werden [86]. An *ex vivo* perfundierten Rattenherzen konnte durch die koronare Perfusion des Bakterientoxins *Escherichia coli* (E. coli) Hämolysin die kardiiale Leukotriensynthese aktiviert werden. Folge hiervon war eine Störung der

myokardialen Perfusion mit Rückgang der linksventrikulären Pumpfunktion [87]. Wie bereits mehrfach erwähnt, sind bakterielle Pathogenitätsfaktoren potente Induktoren vasomotorischer Veränderungen. Die Bedeutung bakterieller Pathogenitätsfaktoren in der Pathogenese der Sepsis wird im Folgenden beschrieben.

2.5 Bakterielle Pathogenitätsfaktoren in der Sepsis

Ein septisches Krankheitsbild kann durch hämatogene Aussaat eines Erregers selbst oder seiner Pathogenitätsfaktoren entstehen. In beiden Fällen kommt es zu einer Aktivierung inflammatorischer Reaktionen. Neben grampositiven und gramnegativen Bakterien können auch andere Mikroorganismen, wie z.B. Pilze, Viren und Parasiten eine Sepsis auslösen. Hierbei ist interessant, dass die Krankheitssymptome, wie auch die kardiovaskulären Veränderungen während der Sepsis oder im septischen Schock, nicht erregerspezifisch sind. Bei Patienten mit grampositiver und gramnegativer Sepsis treten vergleichbare Störungen der myokardialen Kontraktilität auf [88]. Mit Hilfe eines Hundemodells konnten im Tierversuch gleichartige kardiovaskuläre Veränderungen durch grampositive und gramnegative Keime nachgewiesen werden [89]. Zu den bakteriellen Pathogenitätsfaktoren zählen zum einen durch Erreger sezernierte Toxine, sogenannte Exotoxine, wie beispielsweise das α -Toxin von *Staphylococcus aureus*, zum anderen strukturelle Bestandteile der Erreger selbst, sogenannte Endotoxine, wie z.B. die Lipopolysaccharide aus den Zellwänden gramnegativer Mikroorganismen und deren grampositive Äquivalente, z.B. Peptidoglykane und Lipoteichonsäuren.

2.5.1 Exotoxine

Exotoxine sind von Bakterien aktiv sezernierte Pathogenitätsfaktoren. Es handelt sich hierbei um Proteine, die im Gegensatz zu den weiter unten beschriebenen Endotoxinen empfindlich gegen Hitze sind. Die Bildung von Antikörpern wird durch Exotoxine im Organismus stärker angeregt, als durch Endotoxine. Verschiedenste klinisch relevante Erreger sind in der Lage, Exotoxine zu bilden: *Pseudomonas aeruginosa* bildet das die Proteinbiosynthese irreversibel blockierende Exotoxin A, welches über eine Interaktion mit dem β -Rezeptoren-Adenylatcyclase-System die Sensibilität isolierter Kardiomyozyten auf Katecholamine

herabsetzt [90][91]. *Escherichia coli* bildet das Poren bildende Hämolysin (ECH), das zum Teil auch über G-Protein-abhängige sekundäre Zellreaktionen wirkt [92][93]. *Listeria monocytogenes* sezerniert das Listeriolysin O, mit Hilfe dessen es intrazellulär die Membran der Phagosomen lysiert und anschließend frei im Zytoplasma wirken kann [94]. Auch das grampositive Bakterium *Staphylococcus aureus* produziert ein Exotoxin, das sogenannte α -Toxin. Dabei handelt es sich wie bei ECH und Listeriolysin um ein porenbildendes Exotoxin, auf das im Folgenden näher eingegangen wird.

2.5.1.1 *Staphylococcus aureus* α -Toxin

Der Großteil der klinisch relevanten *Staphylococcus aureus* Stämme bildet α -Toxin. Es handelt sich hierbei um ein hydrophiles einkettiges Polypeptid mit einem Molekulargewicht von 34 000 Dalton. Es enthält keine langen hydrophoben Aminosäureanteile. In gelöster Form liegt es als Monomer vor, wobei seine Form durch die β -Faltblattstrukturen bestimmt wird. Die Virulenz des α -Toxins wird durch seine Fähigkeit zur Porenbildung in den Membranen seiner Zielzellmembran bestimmt [95]. Man zählt Poren bildende Toxine heute zu den effektivsten Pathogenitätsfaktoren von Mikroorganismen.

Es sind zwei verschiedene Mechanismen bekannt, über die das α -Toxin an den Wirtszellen binden und Schäden verursachen kann. Liegt es nur in geringer Konzentration (<50 nM) vor, bindet das Proteinmonomer wahrscheinlich über bisher noch nicht genauer identifizierte Bindungsstellen an der Oberfläche verschiedener Zellen, z.B. Endothelzellen, Monozyten, humanen Thrombozyten oder Kaninchenerythrozyten. In höherer Konzentration (>200 nM) kann α -Toxin unspezifisch an alle Lipidmembranen andocken [96]. Dem Andocken schließt sich der nächste Schritt zur Bildung der transmembranären Poren an: Sehr wahrscheinlich wird über eine Konformationsänderung des Toxinmoleküls die zur Porenbildung benötigte Energie gewonnen und es werden hydrophobe Sequenzen freigelegt, welche dann eine Insertion in die Lipidmembran ermöglichen [97]. Daraufhin folgt eine Oligomerisation der Toxinmonomere [95], bei der die Vorstufen der Poren in Form ringförmiger Proteine entstehen, aus denen sich dann durch laterale Diffusion die eigentlichen Poren mit Heptamerstruktur ausbilden [98][99]. Diese Poren sind elektronenmikroskopisch nachweisbar. Ihr Innendurchmesser beträgt etwa 1 bis 2 nm. Infolge der Zellmembranschädigung kommt es zu pathophysiologisch relevanten sekundären Reaktionen

[100][101] und im Extremfall sogar zum Zelltod, ausgelöst durch den Verlust lebenswichtiger Moleküle, wie des ATPs, sowie Veränderung des inneren Ionenmilieus, z.B. durch Wassereinstrom. Bei Erythrozyten entsteht durch diesen Mechanismus eine Zellschwellung mit anschließender Hämolyse, als Grundlage der Bezeichnung „Hämolysine“. In sublytischen Konzentrationen bleiben die toxinsensiblen Zielzellen jedoch intakt. Durch die transmembranösen Poren kann es dann zu Ionenströmen kommen. Von besonderer Bedeutung sind hierbei vermutlich Kaliumströme [101][102], welche die unphysiologische Aktivierung der Zielzellen nach sich ziehen. So kommt es unter anderem zu einer Stimulation der Eicosanoidproduktion, einer Aktivierung von Endonucleasen, Dysfunktion der zellulären Kontraktilität sowie der Freisetzung verschiedener Zytokine [103].

Die pathophysiologischen Effekte des α -Toxins konnten sowohl an isolierten Zellen und Organen als auch im Tierversuch nachvollzogen werden. An isolierten humanen Endothelzellen führt α -Toxin zur Aktivierung der NO- und Prostacyclinfreisetzung [104]. Am isolierten Rattenherzen verursacht α -Toxin eine koronare Vasokonstriktion sowie eine verminderte Kontraktilität durch Aktivierung der Thromboxanbildung [76]. Eine durch Perfusion mit α -Toxin induzierte, ebenfalls durch Thromboxan vermittelte, pulmonale Hypertonie konnte an isolierten Kaninchenlungen nachgewiesen werden [105]. Zusätzlich kam es zu einer gestörten endothelialen Schrankenfunktion mit Ausbildung eines Lungenödems [106]. Bei Schafen löste eine Bolusinjektion gereinigten α -Toxins ein akutes Herzversagen aus [107].

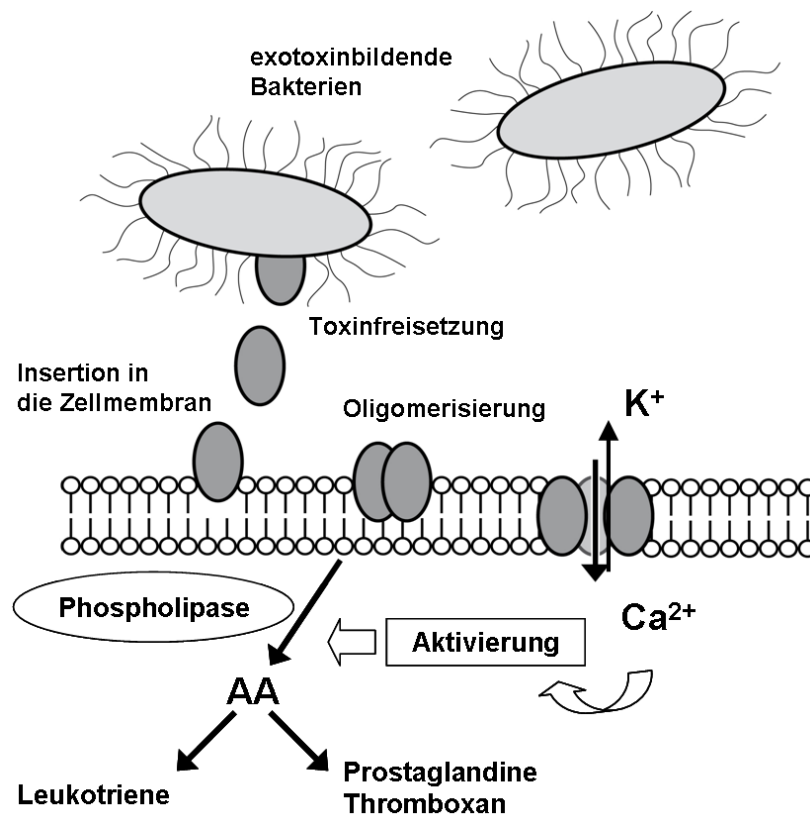


Abbildung 2-3: Porenbildung durch *Staphylococcus aureus* α-Toxin

2.5.2 Endotoxine und Endotoxinäquivalente

Als Endotoxine im engeren Sinne bezeichnet man die Lipopolysaccharide (LPS) der Zellwände gramnegativer Keime. Die Wände grampositiver Bakterien hingegen enthalten Peptidoglykane und Lipoteichonsäuren (LTA). Sie können als Endotoxinäquivalente aufgefasst werden. Endotoxine und ihre grampositiven Äquivalente sind bedeutende Pathogenitätsfaktoren und verantwortlich für eine Vielzahl pathophysiologischer Veränderungen im Rahmen der Sepsis. Sie werden bei Teilung oder beim Zelluntergang von Bakterien freigesetzt. Dies kann im Rahmen einer Antibiotikatherapie zum Auftreten einer typischen Komplikation, der sogenannten Herxheimer-Reaktion führen. Hierbei kommt es durch die massive Endotoxinfreisetzung infolge des Bakterienzerfalls zur überschießenden Freisetzung von Entzündungsmediatoren, welche bei den Patienten Symptome wie Fieber, Schüttelfrost, Kopfschmerzen, Arthralgien oder Myalgien auslösen [108][109]. Außerdem

sind Endotoxine an der Entstehung der kardiovaskulären Veränderungen in der Sepsis beteiligt. An isolierten Kardiomyozyten, wie auch an isolierten Rattenherzen, verursacht Endotoxin eine myokardiale Depression [36][110]. Die negativen Auswirkungen von Endotoxin konnten ebenso im Tiermodell an Kaninchen sowie an gesunden Probanden nachvollzogen werden. Sie reagierten auf die Toxinapplikation mit einer Verminderung des Blutdrucks und des peripheren Widerstandes bei gesteigertem Herzindex, sowie dilatiertem und funktionseingeschränktem Ventrikel nach Volumensubstitution [20][111]. Im Blut septischer Patienten konnten erhöhte Endotoxinspiegel nachgewiesen werden und es wurde ein Zusammenhang zwischen der Höhe des Spiegels und der Mortalität nachgewiesen [112][113].

2.5.2.1 Lipoteichonsäuren (LTA)

Im Vergleich zu den Endotoxinen gramnegativer Bakterien ist über grampositive Pathogenitätsfaktoren weniger bekannt. Aufgrund der wachsenden klinischen Bedeutung grampositiver Erreger rücken sie vermehrt in das Zentrum wissenschaftlichen Interesses. [114][115] Lipoteichonsäuren sind Bestandteile der grampositiven Bakterienwand. Sie sind, wie auch LPS, amphiphile, negativ geladene Glykolipide komplexer Struktur [116] und können verschiedene Entzündungsreaktionen auslösen: So stimulieren sie die Zytokinfreisetzung von Monozyten und Makrophagen [116][117][118], fördern die Expression endothelialer Adhäsionsmoleküle [119] und verursachen im Tierversuch einen septischen Schock mit multiplem Organversagen [120][121]. Untersuchungen zur Pathogenese des Schocks in der grampositiven Sepsis lassen vermuten, dass auch hier der Induktion der iNOS, ähnlich wie im Endotoxin-Schock, große Bedeutung zukommen könnte [120][122][123]. An Ratten konnte gezeigt werden, dass LTA die Freisetzung von TNF- α stimuliert, eine Induktion der iNOS bewirkt und schließlich ein Kreislaufversagen auslösen kann [123]. Weitere Untersuchungen an Tiermodellen konnten belegen, dass durch eine Inhibition der iNOS, die durch LTA ausgelösten Kreislaufveränderungen und Zytokinspiegelanstiege zum Teil verringert werden konnten [122]. Dies gelang auch an isolierten arteriellen Gefäßpräparaten, an denen die LTA-induzierte Hyporeaktivität durch NOS-Inhibitoren abgeschwächt wurde [124]. Zudem konnte gezeigt werden, dass gereinigtes LTA am isoliert perfundierten Rattenherzen, durch eine zum Teil CD-14 abhängige TNF- α -

Freisetzung sowie durch eine Aktivierung der TxA_2 -Bildung infolge Induktion der COX-2, Kontraktilitätsstörungen verursacht [125].

Für die Wirkung von LTA auf die verschiedenen Zellen ist ein ähnlicher Mechanismus wie für LPS beschrieben: An isolierten Zellpopulationen (Monozyten, Endothelzellen und Makrophagen) konnte gezeigt werden, dass LTA an spezifische Oberflächenrezeptoren wie CD-14 oder dem Toll-like-Rezeptor bindet, und hierdurch eine Zellaktivierung mit Zytokinproduktion auslöst. Es folgt eine Signaltransduktionskaskade, welche mit einer Aktivierung nukleärer Transkriptionsfaktoren endet und so die Neusynthese verschiedener proinflammatorischer Zytokine (z.B. $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$), vasoaktiver Mediatoren (NO, Thromboxan, Leukotriene) und verschiedener Adhäsionsmoleküle (P-Selectin, ICAM-1) induziert. Eine Blockade des CD-14-Rezeptors führt zu einer verminderten oder völlig ausbleibenden Zytokinproduktion [126][127][128].

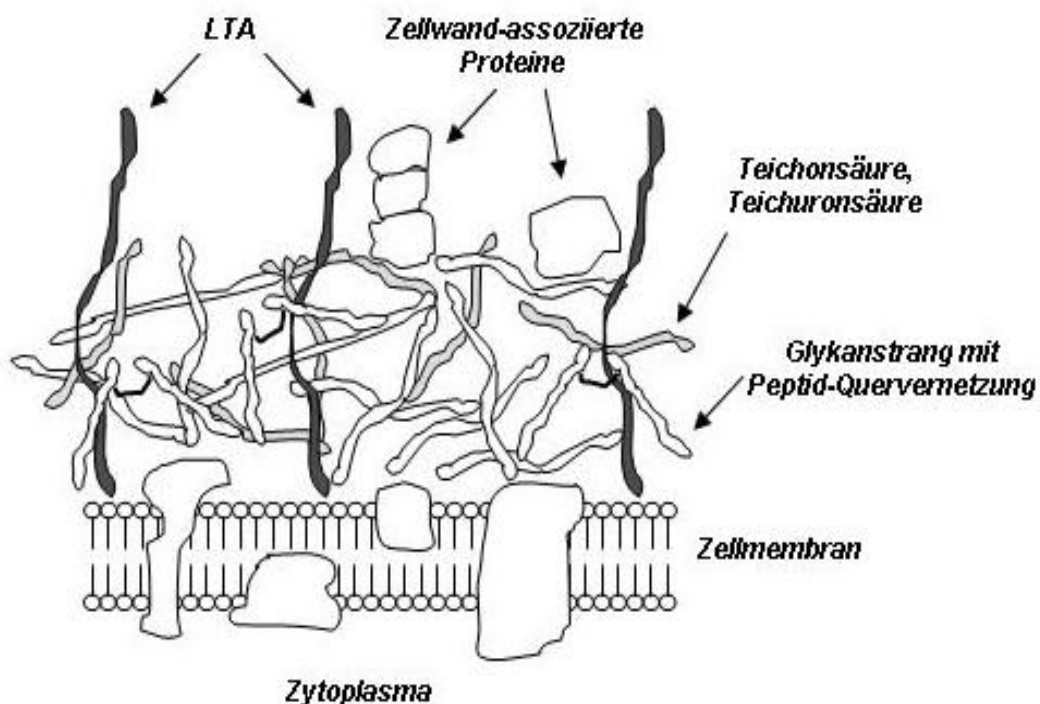


Abbildung 2-4: Lipoteichonsäuren sind Bestandteile der Zellwand grampositiver Bakterien

Ebenso wie die anderen Bakterienwandbestandteile Teichon- und Teichuronsäuren sowie Glykane sind sie durch Peptid-Quervernetzungen verbunden. Sie werden beim Untergang der Bakterien oder bei der Zellteilung freigesetzt.

2.6 Phosphodiesterasen (PDE)

Phosphodiesterasen sind Metallophosphohydrolasen, die die Hydrolyse der second messenger Adenosin- und Guanosin-3',5'-cyclo-monophosphat (cAMP und cGMP) zu den inaktiven 5'-Monophosphaten katalysieren. Sie regeln so, zusammen mit den Adenylat- und Guanylatcyclasen, die intrazellulären Spiegel der beiden second messenger, welche infolge der Stimulation einer Zelle durch sogenannte first messenger, wie z.B. Peptide, NO, Neurotransmitter oder auch Bakterientoxine, intrazellulär gebildet werden [129][130]. Im Jahre 1958, kurz nach der Entdeckung des cAMP, wurde von Sutherland und Rall erstmals eine Phosphodiesteraseaktivität beschrieben [131]. Vier Jahre später gelang Butcher und Sutherland die Reinigung und Charakterisierung von PDEs [132]. Inzwischen sind bei Säugern elf unterschiedliche PDE-Familien gefunden worden. Sie werden von 21 verschiedenen Genen kodiert. Durch variable Transkriptionsstartpunkte sowie alternatives Spleißen entstehen mehr als 50 verschiedene PDE-Isoenzyme. Aufgrund ihrer Substratspezifität kann man die PDE-Familien in drei verschiedene Gruppen einteilen: cAMP-spezifisch (PDE 4,7 und 8), cGMP-spezifisch (PDE 5,6 und 9) und dualspezifisch (PDE 1,2,3,10 und 11) [133][134].

Gemeinsam ist allen PDEs, dass sie aus zwei Hauptdomänen bestehen: der zentralen katalytische Domäne, nahe dem C-terminalen Ende, sowie der variablen, N-terminal gelegenen, regulatorischen Domäne [133][135]. Das katalytische Zentrum des Enzyms wird durch eine bestimmte Folge von etwa 270 Aminosäuren gebildet und es besteht für diese Sequenz eine Homologie von mehr als 60 % für alle elf PDE-Familien. So genannt Scharnierregionen (hinge regions) verbinden diesen Enzymabschnitt mit dem carboxyterminalen Bereich, dessen Funktion noch nicht endgültig geklärt ist, sowie mit der am aminoterminalen Ende gelegenen Regulator-domäne [130]. Diese ist verantwortlich für die Regulation der katalytischen Aktivität, d.h. je nach dem, welches Substrat bindet, kann die PDE aktiviert oder inhibiert werden. Der zugrunde liegende Mechanismus ist noch nicht völlig geklärt, es werden jedoch mögliche Konformationsänderungen innerhalb der katalytischen Domäne für möglich gehalten [133][136][137].

Die PDE-Familien unterscheiden sich durch ihre Aminosäuresequenzen, ihre kinetischen Eigenschaften, ihre Substrat- und Inhibitorspezifitäten, ihre Verteilung in den verschiedenen Geweben, ihre Regulationsmechanismen sowie ihre Anzahl an Isoformen

[133][134][136][137][138]. Für die Signalverarbeitung im kardiovaskulären System sind vor allem die folgenden PDEs von Bedeutung:

Gefäßendothelzellen:	PDE 1(C)
Glatte Gefäßmuskulatur:	PDE 1A,B; PDE 3A,B; PDE 5A; (PDE 4)
Kardiomyozyten:	PDE 1A,C; PDE 2A,A2; PDE 3; PDE 4A,B1,D1-3

Auf Grund ihrer Bedeutung für das kardiovaskuläre System soll kurz etwas näher auf die PDE 5-Familie eingegangen werden.

2.6.1 Phosphodiesterase 5

Ursprünglich wurde die PDE 5 im Jahre 1980 von Coquil et al. aus Thrombozyten isoliert [139] und charakterisiert. Wenig später gelang es, sie auch in Lungengewebe nachzuweisen [140]. Erst nachdem bekannt wurde, dass die PDE 5 an der Regulation der Kontraktion glatter Gefäßmuskulatur beteiligt ist und das Pharmakon Sildenafil diesen Mechanismus beeinflusst, wurde vermehrtes Forschungsinteresse für die PDE 5 geweckt. Heute ist bekannt, dass die PDE 5-Familie aus einem Protein besteht (PDE 5A), von welchem drei Isoformen entdeckt wurden (PDE 5A1-3), die sich nur in ihrer N-terminalen Sequenz unterscheiden. Während PDE 5A3 spezifisch ist für glatte Muskulatur, findet man PDE 5A1 und PDE 5A2 in verschiedenen Geweben, z.B. in Thrombozyten, Lunge, Gehirn sowie in glatter Muskulatur [141][142]. Inzwischen konnte bei Hunden die PDE 5 immunhistochemisch sowohl in den Gefäßen des Herzens, als auch in Kardiomyozyten nachgewiesen werden [143]. Mittels Immunoblot und Immunhistochemie konnte gezeigt werden, dass die PDE 5 im linken Ventrikel des Menschen exprimiert wird, und dass ihre Expression bei dilatativer und ischämischer Kardiomyopathie zunimmt [144].

Die PDE 5-Familie katalysiert hauptsächlich die Hydrolyse von cGMP, welches unter anderem ein second messenger des NO ist. Hierfür sind in der Literatur mehrere Mechanismen beschrieben: Erhöhte cGMP-Konzentrationen im Zytoplasma bewirken, eine Erleichterung der Proteinkinase G- oder Proteinkinase A-vermittelten Phosphorylierung der PDE 5. Neuere Arbeiten weisen jedoch darauf hin, dass auch die alleinige cGMP-Bindung, ohne Zwischenschaltung einer Proteinkinase, zu einer PDE 5-Aktivierung führen kann [145]. In Experimenten mit Kulturen menschlicher *Corpus cavernosum* Zellen konnte gezeigt

werden, dass durch erhöhte cGMP-Spiegel über 48 Stunden, die Expression der PDE 5 gesteigert wird [146]. Interessant sind die therapeutischen Möglichkeiten einer Inhibition der PDE u.a. im Hinblick auf das Gefäßsystem.

2.6.2 Inhibitoren der Phosphodiesterase 5

Mit Hilfe spezieller PDE 5-Inhibitoren, wie z.B. Sildenafil (Viagra[®], Revatio[®]) oder Zaprinast, kann die Wirkung der PDE 5 gezielt inhibiert werden. So wird Sildenafil, welches ursprünglich zur Behandlung von Angina pectoris eingesetzt werden sollte, ebenso wie Tadalafil (Cialis[®]) und Vardenafil (Levitra[®]), inzwischen zur Behandlung der erektilen Dysfunktion eingesetzt. Dem liegt zugrunde, dass es durch die Inhibition der PDE 5 zu einem verringerten cGMP-Abbau im Corpus cavernosum kommt, was zu einer Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur, mit anschließendem Bluteinstrom und so zur Erektion, führt [147][148][149][150]. Außerdem wird Sildenafil heute mit Erfolg bei der Therapie der pulmonalen Hypertonie eingesetzt [149][150][151][152]. Leider sind jedoch auch unerwünschte Arzneimittelwirkungen bei einer Behandlung mit PDE-Inhibitoren nicht ganz auszuschließen. Infolge der enormen Sequenzähnlichkeiten der katalytischen Domänen verschiedener PDE-Familien kann es zu Kreuzreaktionen verschiedener PDEs kommen. So wirkt beispielsweise Sildenafil hemmend auf die PDE 5 und auch auf die PDE 6, welche in der Retina exprimiert wird, wodurch es zu visuellen Störungen kommen kann [147][148][149][150][153].

Da die PDE 5 auch in glatten Muskelzellen des Gastrointestinaltraktes exprimiert wird, und dem NO/cGMP-Signalweg eine große Bedeutung für die Regulation der peristaltischen Motilität des Gastrointestinaltraktes zukommt, wird eine therapeutische Intervention mit PDE 5-Inhibitoren für verschiedene Motilitätsstörungen in Erwägung gezogen [154]. Im Tierversuch konnte bereits eine Relaxation des unteren Ösophagussphinkters durch eine Verabreichung von Sildenafil nachgewiesen werden [155].

2.6.3 Potentieller klinischer Einsatz von PDE-Inhibitoren

Bei der Behandlung der pulmonalen Hypertonie wurde Sildenafil, aus der Reihe der bis dato klinisch eingesetzten PDE-Inhibitoren, das größte Potential zur pulmonalen Vasodilatation und zum Lagzeitanfiremodeling in der Lunge zugesprochen [156]. Im Jahre 2005 konnte im Tiermodell an Hasen gezeigt werden, dass durch Kombination eines PDE-Inhibitors mit inhaliertem Iloprost die pulmonale Vasodilatation signifikant verstärkt und verlängert werden kann, wobei bei Sildenafil verglichen mit anderen PDE-Inhibitoren der stärkste Effekt nachzuweisen war. Es wurde vermutet, dass die Wirkung von Sildenafil über sowohl die PDE 1, als auch PDE 5 zustande kommt [157]. Auch durch Kombination von Sildenafil mit inhaliertem Treprostinil, einem synthetischen Prostazyklin, konnte bei Patienten mit pulmonaler Hypertonie ebenfalls eine zusätzliche selektive pulmonale Vasodilatation nachgewiesen werden [158].

Auch LASSBio596, ein weiterer PDE 4 + 5-Inhibitor, zeigte im experimentellen Tiermodell einen starken antiinflammatorischen und antiproliferativen Effekt [159]. Die PDE 5 scheint zusätzlich eine große Rolle bei der kardiovaskulären Regulation zu spielen, weshalb große Hoffnungen in die Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen durch PDE-Inhibitoren gesetzt werden [160]. Tierversuche konnten für Sildenafil einen kardioprotektiven Effekt bei Herzmuskelschäden, infolge Ischämie-Reperfusion sowie bei der Apoptose und linksventrikulären Dysfunktion infolge einer Doxorubicin-induzierten Kardiomyopathie, zeigen [161][162]. Bei Patienten mit Linksherzinsuffizienz und sekundärer pulmonaler Hypertonie kann durch orale Verabreichung von Sildenafil eine Verbesserung der körperlichen Belastbarkeit erreicht werden, wie eine 2007 veröffentlichte Studie zeigt [163].

2.7 Fragestellung

Das Krankheitsbild der Sepsis ist in der heutigen Intensivmedizin unverändert von größter Relevanz und limitiert häufig die Behandlung chronisch kranker, alter oder immuninkompetenter Patienten. Die kardiovaskulären Veränderungen der Sepsis, zu denen die septische Kardiomyopathie wesentlich beiträgt, haben hierbei einen entscheidenden Einfluss auf den Verlauf dieses Krankheitsbildes. Es ist inzwischen akzeptiert, dass bakterielle Pathogenitätsfaktoren in der Pathogenese der Sepsis von entscheidender Bedeutung sind. Experimentelle Untersuchungen legen nahe, dass sowohl das porenbildende Exotoxin α -Toxin des klinisch relevanten grampositiven Sepsiserregers *Staphylococcus aureus*, als auch dessen Zellwandbestandteile Lipoteichonsäuren in der Lage sind, eine Sepsis sowie eine septische Kardiomyopathie auszulösen. Im Hinblick auf die septische Kardiomyopathie könnte der Toxin-aktivierten Freisetzung vasoaktiver Mediatoren große Bedeutung zukommen. Die exzessive Bildung von NO ist an der Pathogenese der kardivaskulären Komplikationen in der Sepsis beteiligt. Die Wirkung von NO wird durch den Abbau seines Second Messengers cGMP durch Phosphodiesterasen moduliert. Mittlerweile sind spezifische Inhibitoren der PDE 5, wie z.B. Sildenafil, für den klinischen Einsatz verfügbar.

Vor diesem Hintergrund wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss einer Inhibition von Phosphodiesterasen auf die toxinvermittelte Kardiodepression untersucht. Hierbei wurden das Exotoxin α -Toxin und das Endotoxin-Äquivalent LTA von *Staphylococcus aureus* in einem Modell des isoliert perfundierten Rattenherzens untersucht. Die einzelnen Fragestellungen lauteten wie folgt:

1. Kann durch die koronare Perfusion von α -Toxin oder LTA eine signifikante Kardiodepression am Modell des isolierten Rattenherzens hervorgerufen werden?
2. Führt die koronare Perfusion von α -Toxin zur Freisetzung kardiodepressiver oder vasoaktiver Mediatoren?
3. Können die kardiodepressiven Effekte von α -Toxin und LTA durch spezifische Inhibition der PDE 5 beeinflusst werden?
4. Kommt es durch Inhibition der PDE 5 auch zu einer Modulation der Mediatorfreisetzung?

3 Material und Methodik

3.1 Material

3.1.1 Versuchstiere

Für die Experimente wurden ausschließlich männliche Wistar Ratten der Firma Charles River Wiga (Sulzfeld, Deutschland) mit einem Gewicht von 180 - 350g verwendet.

3.1.2 *Staphylococcus aureus* α -Toxin und Lipoteichonsäure

Das gereinigte α -Toxin von *Staphylococcus aureus* wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. S. Bhakdi, Institut für Medizinische Mikrobiologie, Johannes-Gutenberg-Universität Mainz, zur Verfügung gestellt. Das lyophilisierte Toxin wurde in einer Konzentration von 2 mg/ml in Phosphatpuffer gelöst und bei -80 °C gelagert. Für die täglichen Versuche wurden Aliquots der Größe 50 μ g/25 μ L hergestellt und bei -20 °C für höchstens 4 Wochen gelagert.

Die Lipoteichonsäure von *Staphylococcus aureus* wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. T. Hartung, Institut für Biochemische Pharmakologie der Universität Konstanz zur Verfügung gestellt. Die Reinheit lag bei über 99 % [118]. Die LTA wurde in lyophilisierter Form geliefert, in Aqua dest. gelöst und in Aliquots zu 100 μ g/10 μ L bei -20 °C gelagert.

Mit Hilfe des Limulus Amebocyte Lysate Test konnte eine Kontamination der α -Toxin- und LTA-Aliquots mit LPS ausgeschlossen werden.

3.1.3 Pharmaka

Im Rahmen der experimentellen Untersuchungen kamen folgende Substanzen zur Anwendung:

- Dimethylsulfoxid (DMSO), Sigma, Deisendorf, Deutschland

- Forene[®] (Isofluran), Abbott, Wiesbaden, Deutschland
- Isotone Natriumchloridlösung 0,9 %, Braun, Melsungen, Deutschland
- Liquemin[®] (Heparin-Natrium), Hoffmann-La Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland
- Narcoren[®] (Pentobarbital-Natrium), Merial, Hallbergmoos, Deutschland
- Sildenafil, Pfizer, Freiburg, Deutschland
- Zaprinast, Calbiochem, Bad Soden, Deutschland

3.1.4 Material und Geräte für die Organperfusion

Für die Perfusion der Organe wurden die nachfolgend genannten Materialien und Geräte verwendet:

- Aortenkanüle aus Edelstahl (Innendurchmesser 1,5 mm, Außendurchmesser 2 mm) und Latexballon (Größe 4 oder 5, je nach Gewicht des Versuchstiers), Hugo Sachs Elektronik, Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten, Deutschland
- Brückenverstärker, Schwarzer DME 48 S, Picker, München, Deutschland
- Carbogen (5 % CO₂, 95 % O₂), Messer Griesheim, Siegen, Deutschland
- Differenzierer, Schwarzer DRE 48, Picker, München, Deutschland
- Druckaufnehmer COMBITRANS, B. Braun, Melsungen, Deutschland
- Krebs-Henseleit-Perfusatlösung (Elektrolytlösung I/3), Serag-Wiessner, Naila, Deutschland [Zusammensetzung (in mM): NaCl (125,00), Glucose (13,32), KCl (4,30), CaCl₂·2H₂O (2,40), MgCl₂·6H₂O (1,30), KH₂PO₄ (1,10)]
- Natriumhydrogenkarbonat (NaHCO₃) 8,4 %, Baxter, Unterschleißheim, Deutschland; (25,00 mM in Krebs-Henseleit-Perfusatlösung)
- Organkammer aus doppelwandigem Glas (70 ml), Hohlglas, Lich, Deutschland
- Oxygenator aus doppelwandigem Glas (250 ml), Hohlglas, Lich, Deutschland
- Schlauchpumpe, MS-4 Reglo 8-100, Ismatec, Glattbrugg, Schweiz

- Stimulationsgerät, Stimulator P Typ 201, Hugo Sachs Elektronik, Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten, Deutschland
- Tygon®-Pumpenschläuche (Innendurchmesser 3,18 mm), Ismatec, Glattbrugg, Schweiz
- Umwälzpumpe Thermomix BU, B. Braun, Melsungen, Deutschland

3.1.5 Analytische Testkits

Zur Untersuchung der Perfusatproben auf Thromboxan B₂, bzw. TNF- α wurden folgende Kits verwendet:

- Thromboxane B₂-ELISA, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA
- Rat TNF- α ELISA, BioSource International Inc., Camarillo, California, USA

Zur Prüfung der Toxine und des Perfusats auf Kontamination mit Endotoxin wurde folgender Test verwendet:

- Limulus Amebocyte Lysate Test Qcl-1000, BIO Whittaker, Walkersville, Maryland, USA

3.2 Methodik

3.2.1 Prinzip der Methode zur Perfusion isolierter Rattenherzen nach O. Langendorff

Die im experimentellen Teil dieser Arbeit angewandte Methode zur Perfusion isolierter Rattenherzen beruht auf einer 1895 erstmals durch den Physiologen O. Langendorff beschriebenen Methode [164]. Es wird hierbei ein zuvor frei präpariertes und isoliertes Säugetierherz retrograd über den Stumpf der Aorta perfundiert, wobei für das Gelingen des Versuches die Suffizienz der Aortenklappe von enormer Wichtigkeit ist. Bei intakter Klappenfunktion wird das über den Aortenstumpf eingeleitete Perfusat über die oberhalb der Aortenklappe gelegenen Koronarostien in die koronare Strombahn weitergeleitet, ohne in die linke Kammer abzufließen, und versorgt auf diesem Wege das Myokard (s. Abb. 1).

Man erhält so bei intaktem Reizleitungssystem des Herzens ein spontan schlagendes, isoliertes Organ mit quasi leeren Herzkammern. An diesem können nun verschiedene physiologische Parameter erhoben werden und im Herzen synthetisierte Mediatoren im organeffluenten Perfusat ermittelt werden.

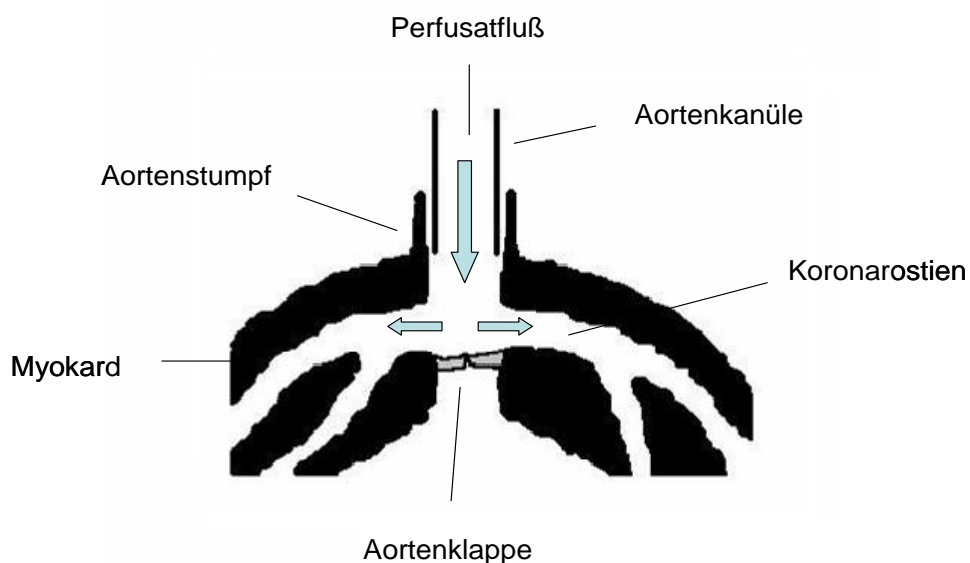


Abbildung 3-1: Prinzip der Organperfusion nach O. Langendorff

3.2.2 Versuchsaufbau

Das isolierte Herz hängt mit der Aorta an einer Kanüle in einer 37 °C warmen Organkammer und wird dort kontinuierlich und luftblasenfrei, über eine Rollerpumpe gesteuert, mit Elektrolytlösung perfundiert. Die Elektrolytlösung wird zuvor im Oxygenator mit Carbogen gesättigt und auch erwärmt. Organkammer und Oxygenator besitzen durch doppelwandiges Glas eine äußere Kammer, welche über Schlauchsysteme mit einem stets beheizten Wasserbad verbunden sind. Das warme Wasser wird kontinuierlich durch die Glaskammern gepumpt, so dass Perfusat und Organkammer auf 37 °C erwärmt werden. Das Perfusat erreicht so einen pO_2 von 500 +/- 45 mmHg, einen pCO_2 von 35 +/- 5 mmHg und einen pH von 7,4 +/- 0,03. Nach Durchströmung der Koronarien wird das abtropfende Organeffluat aus der Organkammer abgeleitet und über einen Filter mit einer Porengröße von 15 μ m mit einer Rollerpumpe zurück in den Oxygenator gepumpt. Durch den Filter werden eventuell anfallende Gewebeteilchen des Organs oder auch akzidentiell in die Organkammer gelangte partikuläre Verunreinigungen zurückgehalten.

Zwischen Organkammer und Filter ist ein Dreiwegehahn eingebaut, welcher die Entnahme von Perfusatproben ermöglicht. Der koronare Perfusionsdruck (CPP) wird zwischen Rollerpumpe und dem aufgehängten Organ, direkt oberhalb der Aortenkanüle, gemessen. Über einen Latexballon, welcher im linken Ventrikel des Herzens platziert wird, kann über einen Druckaufnehmer (Combitrans) und einen Brückenverstärker (Schwarzer DME 48 S) der linksventrikuläre Druck (LVP), sowie mit einem Differenzierer (Schwarzer DER 48) auch die maximale linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit (dp/dt_{max}) ermittelt werden. Ein Stimulator wird im Vorhofbereich des Herzens platziert und sorgt so für eine konstante Herzfrequenz während des gesamten Versuchsablaufes. Auf diese Weise können frequenzabhängige Kontraktilitätsänderungen des Myokards ausgeschlossen werden.

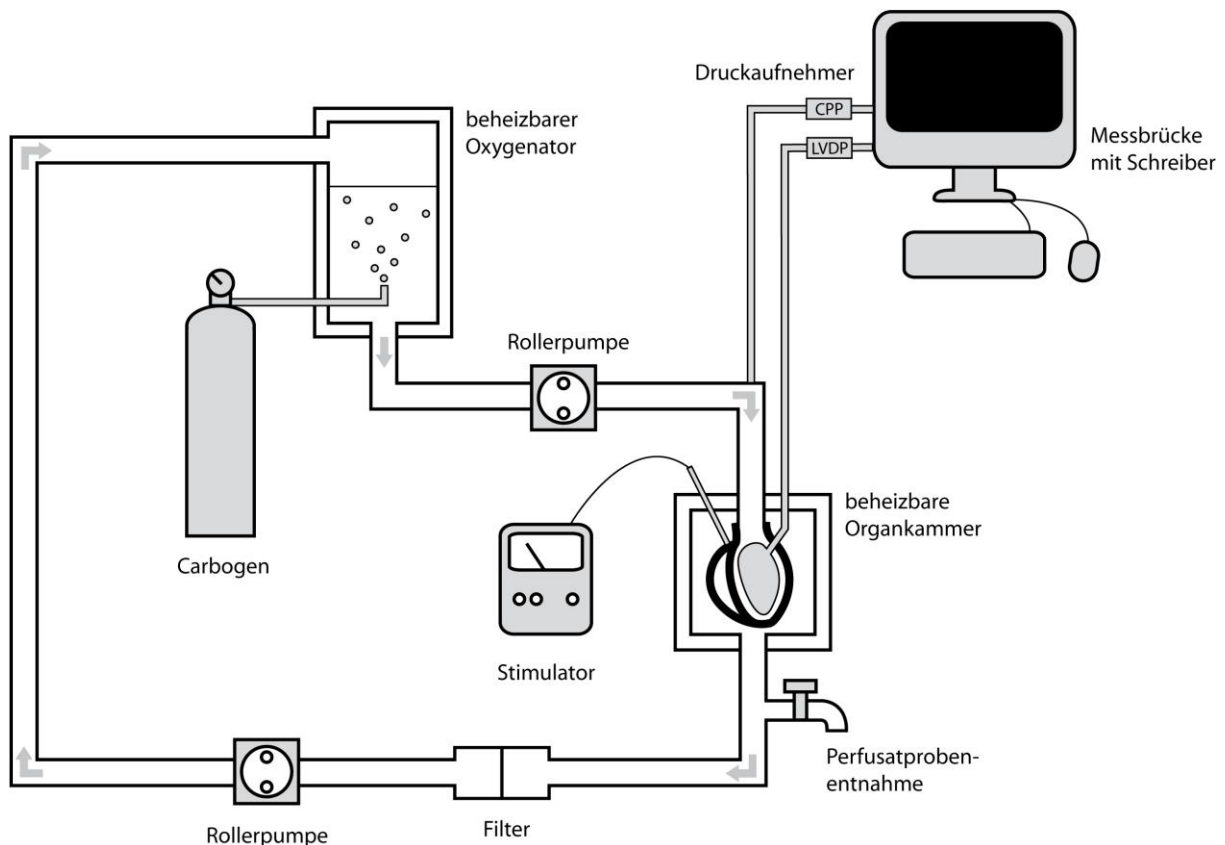


Abbildung 3-2: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Perfusion isolierter Organe nach O. LANGENDORFF.

3.2.3 Entnahme und Präparation der Herzen

Zunächst wurden die Ratten in einem luftdichten Behälter mit 1 ml Isofluran (Forene[®]) in Inhalationsnarkose gelegt. Nach dem Einschlafen wurde ihnen zur Erhaltung der Narkose Pentobarbital-Natrium (Narcoren[®]) in einer Konzentration von 0,375 mg/kg Körpergewicht intraperitoneal injiziert, welches zuvor mit Natrium-Heparin (Liquemin[®]) gemischt wurde (Dosis: 3000 IU/kg Körpergewicht), um so einer intrakoronaren Thrombenbildung vorzubeugen.

Nach Überprüfung des Cornealreflexes und der Sensibilität, zur Sicherstellung einer ausreichenden Narkosetiefe, wurde mit der Präparation begonnen. Über einen Hautschnitt vom Nabel bis zum Sternum und eine anschließende Inzision der Bauchwand im Nabelbereich wurde die Bauchhöhle eröffnet und die Öffnung über zwei V-förmige Schnitte, in Richtung der lateralen Rippenuntergrenzen, erweitert. Unter Fixation des Brustkorbes,

mittels Pinzette am Xyphoid, erfolgte die Durchtrennung der die Leber und das Zwerchfell verbindenden Bänder. Nun wurde das Zwerchfell mit einem Schenkel der Präparationsschere möglichst lateral perforiert, die Rippen dieser Seite nach kranial durchtrennt, das Zwerchfell ebenfalls durch Scherenschlag an der ventralen Seite von den Rippenbögen abgetrennt und die Rippen der anderen Seite durchtrennt. Im nächsten Schritt wurde das noch schlagende Herz mit einer Hand vorsichtig umfasst und mit einem Scherenschlag oberhalb der Herzbasis von den großen Gefäßen abgetrennt. Hierbei war es wichtig, einen ausreichend langen Aortenstumpf zu belassen, um später das isolierte Organ mit diesem an der Perfusionskanüle aufhängen zu können.

Anschließend wurde das isolierte Rattenherz zügig in ein vorbereitetes Schälchen mit eisgekühlter Krebs-Henseleit-Perfusatlösung gegeben, woraufhin die Herzaktion rasch erlosch. Nach vorsichtigem Schwenken in diesem Töpfchen, zum Auswaschen größter Blutrückstände, wurde das Herz für die weitere Präparation in eine flache Schale, ebenfalls gefüllt mit eisgekühlter Krebs-Henseleit-Perfusatlösung, gegeben. Unter der Kältekardioplegie konnte das isolierte Herz nun von Perikard-, Bindegewebs- und Thymusresten sowie von Aortenverzweigungen befreit werden. Die eben beschriebene Entnahme und Präparation des Rattenherzens dauerte nicht länger als eine Minute.

3.2.4 Perfusion der Herzen

Nach Abschluss der Präparation wurde der Stumpf der Aorta über die Perfusionskanüle gezogen und mit einer Ligatur fixiert und abgedichtet. Letzte Entfernungen von Gefäßstümpfen der Lungenvenen ermöglichten den freien Zugang zum linken Vorhof und Ventrikel. Über die Perfusionskanüle wurde das Herz mit einem kontinuierlichen Fluss von etwa 10 ml/min/g Herzgewicht mit 37 °C warmem, carbogengesättigtem und mit Natriumhydrogenkarbonat modifiziertem Krebs-Henseleit-Perfusat versorgt. Sobald die Kältekardioplegie aufgehoben war, begann bei noch intaktem Reizleitungssystem wieder eine Spontanaktion des Herzens. Zum Befreien des Organs von Blutresten wurden es mit 150 ml Perfusat gespült und um das Versuchssystem blutfrei zu halten, wurden diese aufgefangen und verworfen. Während des Spülvorganges wurden die letzten Vorbereitungen für den eigentlichen Versuchsablauf getroffen: In den linken Ventrikel wurde ein kleiner Latexballon eingebracht und an der Aufhängung der Kanüle befestigt; der Druckaufnehmer wurde

luftblasenfrei oberhalb der Perfusionskanüle an das System angeschlossen und beides kalibriert. Als letztes wurde der Stimulator im Bereich des rechten Vorhofs platziert und das Herz mit einer konstanten Frequenz von ca. 360 Schlägen pro Minute oberhalb seiner physiologischen Eigenfrequenz stimuliert.

Nach Durchlauf der beschriebenen Spülmenge an Perfusat wurde das System auf rezirkulierend umgestellt und das Herz frei hängend in der 37 °C warmen Organkammer positioniert. Im System befanden sich nun 50 ml rezirkulierenden Perfusats. Für die rezirkulierende Menge von 50 ml Perfusat entschied man sich, da so einerseits, trotz der nur begrenzt zur Verfügung stehenden Menge an aufgearbeiteten Bakterientoxinen, eine ausreichende Toxinkonzentration für die gewünschten Effekte am isolierten Rattenherzen erreicht werden konnten und sich andererseits anfallende Metabolite in genügend hoher Konzentration im Perfusat anreichern konnten, um sie mit den zur Verfügung stehenden Analyseverfahren nachweisen zu können (2).

3.2.5 Messung physiologischer Parameter am isolierten Rattenherzen

Während der Experimente wurden verschiedene physiologische Parameter der isolierten Rattenherzen ermittelt und protokolliert:

Ein spezielles Druckmesssystem, bestehend aus einem mit Aqua dest. gefüllten Schlauchsystem und eingeschaltetem Druckaufnehmer (Combitrans), welches kurz oberhalb der Aortenperfusionskanüle abzweigte, erfasste kontinuierlich den koronaren Perfusionsdruck (CPP) als Maß für den koronaren Gefäßwiderstand. Dieser stieg mit zunehmender Vasokonstriktion. Die erfassten Werte wurden über einen Brückenverstärker an einen PC weitergeleitet und hier protokolliert.

Über einen Zugang im linken Vorhof wurde ein ebenfalls mit A. dest gefüllter Latexballon in den linken Ventrikel des isolierten Herzens vorgeschoben. Dieser Ballon wurde während der unmittelbaren Versuchsvorbereitung mit so viel Flüssigkeit gefüllt, dass er den Ventrikel komplett ausfüllte und ein enddiastolischer Druck von 10 mmHg eingestellt war. Auf diese Weise konnte anhand der isovolumetrischen Kontraktion des Myokards der linksventrikuläre Druck (LVP) ermittelt und über das an den Ballon angeschlossene Schlauchsystem zu einem

Druckaufnehmer weitergeleitet werden. Die dort erfassten Werte wurden ebenfalls durch einen Brückenverstärker amplifiziert und an den PC weitergeleitet.

Mit Hilfe der registrierten Werte des LVP konnten aus der Differenz des maximalen systolischen Druckes und des enddiastolischen Druckes die Werte des linksventrikulär entwickelten Drucks (LVDP = left ventricular developed pressure), die Herzfrequenz (HR) sowie die maximale linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit (dp/dt) als weiterer Kontraktilitätsparameter ermittelt werden.

3.2.6 Standardversuchsprotokoll

Zunächst wurden das an der Aortenkanüle hängende Herz in einem offenen System mit 150 ml Perfusat gespült, um es von Blutresten zu befreien. Das Perfusat wurde verworfen. Anschließend wurde bei einer verbleibenden Perfusatmenge von 50 ml rezirkulierend perfundiert. Sobald sich ein Äquilibrium („Steady-State“) eingestellt hatte, d.h. sich CPP, LVDP und dp/dt_{max} auf stabilem Niveau eingependelt hatten, wurden die Versuchsaufzeichnungen begonnen. Es begann mit einem 25-minütigen Vorlauf (-25. Minute bis 0. Minute), zu Beginn und zum Ende dessen erstmals Perfusatproben genommen wurden (LW1 und LW2). Alle Rattenherzen, bei denen die physiologischen Parameter bis zum Ablauf der Vorlaufzeit nicht im Steady-State geblieben waren, wurden von weiteren Untersuchungen ausgeschlossen.

In der 0. Minute erfolgte die Zugabe des entsprechenden Toxins: α -Toxin in der Endkonzentration von 1,5 $\mu\text{g/ml}$ bzw. LTA in der Endkonzentration von 2 $\mu\text{g/ml}$. Je nach Versuch wurde zuvor in der -10. Minute Sildenafil oder Zaprinast in einer Konzentration von 10 μM zugesetzt. Die Versuche mit α -Toxin liefen ab der 0. Minute für weitere 60 Minuten, wobei Perfusatproben mit einem Volumen von jeweils 1 ml nach den Minuten 0, 10, 20, 30, 40, 50 und 60 entnommen wurden. Die LTA-Versuche liefen für weitere 180 Minuten und es wurden Proben nach der 0., 30., 60., 90., 120., 150. und 180. Minute entnommen.

Folgende Versuchsreihen mit jeweils mindestens 5 Experimenten wurden für diese Arbeit durchgeführt:

- Kontrolle 60 min/ 180 min

3 Material und Methodik

- | | |
|--|---------|
| • α -Toxin (1,5 $\mu\text{g/ml}$) | 60 min |
| • α -Toxin (1,5 $\mu\text{g/ml}$) + Sildenafil (10 μM) | 60 min |
| • α -Toxin (1,5 $\mu\text{g/ml}$) + Zaprinast (10 μM) | 60 min |
| | |
| • LTA (2 $\mu\text{g/ml}$) | 180 min |
| • LTA (2 $\mu\text{g/ml}$) + Sildenafil (10 μM) | 180 min |
| • LTA (2 $\mu\text{g/ml}$) + Zaprinast (10 μM) | 180 min |

Um direkte Einflüsse der Pharmaka Sildenafil und Zaprinast auf die physiologischen Parameter der Rattenherzen ausschließen zu können, wurden zusätzlich Kontrollversuche allein mit den Pharmaka in den entsprechenden Konzentrationen durchgeführt.

3.2.7 Nachweis von Thromboxan A_2 in Perfusatproben

Das Prostanoid Thromboxan A_2 ($\text{Tx}A_2$) ist ein Syntheseprodukt der Arachidonsäure. Da $\text{Tx}A_2$ nur eine sehr kurze Halbwertszeit hat, kann mit Hilfe kommerzieller ELISA-Test-Kits (Cayman Chemical) das stabile, inaktive, nicht-enzymatische Hydrolyseprodukt Thromboxan B_2 ($\text{Tx}B_2$) im Perfusat bestimmt werden. Diesem ELISA liegt folgendes Prinzip zugrunde: Der Analyt (hier $\text{Tx}B_2$) und eine bestimmte Menge an Tracer konkurrieren um eine konstante Anzahl Bindungsstellen eines $\text{Tx}B_2$ -spezifischen Kaninchenantiseraums. Somit ist die Menge an gebundenem Tracer umgekehrt proportional zur Menge des gebundenen Analyts. Der Tracer besteht aus einer an $\text{Tx}B_2$ gekoppelten Acetylcholinesterase (AChE). Die Gemische mit den entstandenen Immunkomplexen, bestehend aus Analyt bzw. Tracer und Kaninchenimmunglobulin, werden anschließend auf eine mit Anti-Kaninchen-Antikörpern beschichtete Mikrotiterplatte pipettiert und dort gebunden. Im nachfolgenden Arbeitsschritt werden die ungebundenen Anteile des Tracers ausgewaschen. Anschließend wird ein chromogenes Substrat (Acetylthiocholin und 5,5'-Dithio-Bis-(2-Nitrobenzoesäure)) hinzugegeben, welches von der Acetylcholinesterase des Tracers zu der gelben 5-Thio-2-Nitrobenzoesäure umgesetzt wird. Diese kann photometrisch bei einer Wellenlänge von 412 nm quantifiziert werden und über diesen Wert die in umgekehrt proportionalem

Verhältnis stehende Menge des Analyts ermittelt werden. Die Lagerung der Perfusatproben bis zur Durchführung der ELISAs erfolgte bei -20 °C.

3.2.8 Nachweis von TNF- α in Perfusatproben

Der quantitative Nachweis von TNF- α erfolgte ebenfalls mit Hilfe kommerzieller Testkits. Hierbei wurden die zu analysierenden Perfusatproben auf Mikrotiterplatten pipettiert, auf welchen spezifische Antikörper gegen Ratten-TNF- α fixiert waren. Nach Zugabe eines zweiten, biotinylierten Antikörpers folgte die erste Inkubationsphase, während der das TNF- α -Antigen an der einen Seite an den an der Platte fixierten Antikörper und an der anderen Seite an den freien biotinylierten Antikörper band. Anschließend wurden die überschüssigen freien Antikörper entfernt und das Enzym Streptavidin-Peroxidase hinzugegeben. Dieses Enzym band während der anschließenden Inkubationszeit an den mit dem TNF- α verbundenen biotinylierten Antikörper. Im Anschluss wurde die Platte mehrmals gewaschen, um ungebundenes Enzym zu entfernen, und schließlich eine spezielle Substratlösung (Tetramethylbenzidin) hinzugegeben, welche von dem gebundenen Enzym zu einer farbigen Lösung umgewandelt wurde. Die Intensität der verschiedenen Lösungen wurde nun bei 450 nm photometrisch bestimmt, wobei sie direkt proportional zur TNF- α -Konzentration der untersuchten Probe war.

Aufgrund der Thermolabilität des TNF- α wurden die während der Versuchsreihen gewonnenen Perfusatproben direkt in flüssigen Stickstoff gegeben und anschließend bei -80 °C gelagert.

3.2.9 Prüfung auf Kontamination der LTA mit Endotoxin

Um eine möglich Verunreinigung der LTA durch Endotoxin ausschließen zu können, wurde der Limulus Amebocyte Lysate (LAL) Test durchgeführt. Das Testprinzip beruht auf folgenden Gegebenheiten: Spezielle Amöbozyten, welche aus der Hämolymphe des Pfeilschwanzkrebses (*Limulus polyphemus*) stammen, koagulieren nach Kontakt mit Endotoxin. Bei diesem Koagulationsprozess kommt es zu einer ähnlichen Kaskade wie während der Blutkoagulation von Säugetieren.

Der LAL-Test enthält ein Proenzym aus diesen Amöbozyten, welches nach Zugabe von Endotoxin oder einer endotoxinhaltigen Probe durch eine katalytische Wirkung des Endotoxins zum aktiven Enzym umgewandelt wird. Die Menge an aktiviertem Enzym ist dabei proportional zum Endotoxingehalt der Probe. Um anschliessend die Enzymmenge quantifizieren zu können, muss das farblose Substrat Ac-Ile-Glu-Ala-Arg-p-Nitroanilin hinzugefügt werden, von welchem das zuvor entstandene aktive Enzym schliesslich den farbigen Stoff p-Nitroanilin abspaltet. Dieser kann anschliessend photometrisch bei 405 – 410 nm bestimmt werden und korreliert mit dem Gehalt des in der Probe vorhandenen Endotoxins. Durch Messung gegen Standards ist eine genaue Quantifizierung des Endotoxingehaltes möglich.

3.2.10 Auswertung und Statistik

Die Werte für die Änderung des koronaren Perfusionsdrucks (CPP) und somit des koronaren Gefäßwiderstandes wurden als Differenz (Δ) der Ausgangswerte zum Zeitpunkt Minute 0 angegeben, d.h. nach Ablauf der Äquilibratorungs- und Versuchsvorlaufphase. Ebenso wurden die mittels ELISA gemessenen Konzentrationen an TxB_2 als Differenz der Werte zum Zeitpunkt Minute 0 angegeben. Sowohl der LVDP als auch $\text{dP/dt}_{\text{max}}$ wurde als Messgröße der myokardialen Kontraktilitätsänderung in Form von Relativwerten und somit als prozentuale Veränderungen der Ausgangswerte, ebenfalls in der 0. Minute, angegeben.

Alle in dieser Arbeit angegebenen Werte sind arithmetische Mittelwerte aus mindestens fünf voneinander unabhängigen Experimenten mit dem jeweiligen Standardfehler des Mittelwertes (\pm SEM). Zur Untersuchung auf statistische Signifikanz wurden die Daten mit einer Varianzanalyse sowie mit dem Tukey's Honestly Significance Difference Test als post-hoc Test überprüft. Werte von $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen.

4 Ergebnisse

4.1 Übersicht

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit standen experimentelle Untersuchungen zur Bedeutung zyklischer Nukleotide bei der Genese der septischen Kardiomyopathie. Am Modell des isoliert perfundierten Rattenherzens wurde mit Hilfe der bakteriellen Pathogenitätsfaktoren α -Toxin und LTA die kardiale Depression in der Sepsis simuliert. Je nach Toxin erfolgte die Perfusion der Herzen über eine oder drei Stunden. Hierbei wurden die physiologischen Parameter der Koronardurchblutung, in Form des koronaren Perfusionsdruckes (CPP) sowie der myokardialen Kontraktilität, in Form des linksventrikulär entwickelten Druckes (LVDP) und der maximalen linksventrikulären Druckanstiegsgeschwindigkeit (dp/dt_{\max}), protokolliert. In weiteren Versuchsreihen wurde der Einfluss zweier Phosphodiesterase-5-Inhibitoren, Sildenafil und Zaprinast, auf die physiologischen Herzparameter untersucht. Nachdem hierbei ein positiver Effekt auf die toxininduzierten myokardialen Kontraktilitätsänderungen nachgewiesen werden konnte, erfolgte eine Analyse der während der Versuchsreihen gewonnenen Perfusatproben. Ziel war herauszufinden, ob eine veränderte Freisetzung kardiodepressiver Mediatoren in Zusammenhang mit der verbesserten myokardialen Kontraktilität infolge Inhibition der PDE 5 stehen könnte.

4.2 Einfluss bakterieller Toxine auf die physiologischen Parameter isoliert perfundierter Rattenherzen

4.2.1 Parameter bei toxinfreier Perfusion

In einstündigen Kontrollversuchen ohne Zusatz von α -Toxin konnte gezeigt werden, dass sich der CPP während des gesamten Versuchsverlaufs nur wenig änderte. Er stieg von 56 mmHg in der 0. Minute auf 73 mmHg in der 60. Minute. LVDP und dp/dt_{\max} wiesen während der gesamten Beobachtungszeit sogar annähernd konstante Werte auf.

4 Ergebnisse

Analog dazu konnte in dreistündigen Kontrollversuchen nachgewiesen werden, dass sich die koronare Perfusion auch nach 180 Minuten nur leicht verschlechterte. Der CPP stieg auch hier lediglich auf 73 mmHg. Für die myokardiale Kontraktilität konnte auch nach drei Stunden keine signifikante Verschlechterung verzeichnet werden (siehe Tab. 4-1).

	0'	30'	60'	90'	120'	150'	180'
CPP (mmHg)	49	56	60	64	67	70	73
LVDP (mmHg)	89	93	94	95	95	95	93
dP/dt (mmHg/min)	3081	3331	3419	3456	3494	3394	3325
HR *	360	360	360	360	360	360	360

* gepaced

Abbildung 4-1: Physiologische Parameter isoliert perfundierter Rattenherzen über 180 Minuten bei toxinfreier Perfusion (Absolutwerte)

4.2.2 Wirkung von α -Toxin

Nach Zugabe von α -Toxin in der Endkonzentration 1,5 μ g/ml Perfusat kam es zu einer deutlichen Veränderung der myokardialen Perfusion. Der CPP stieg von der 0. Minute bis zur 60. Minute um 29 mmHg an, wobei innerhalb der ersten 20 Minuten der steilste Anstieg zu verzeichnen war und der Wert in der 20. Minute sogar um 35 mmHg oberhalb des Ausgangswertes lag. Auch die Parameter der myokardialen Kontraktilität zeigten sich deutlich verändert: Der LVDP fiel bis zur 60. Minute auf 77 % des Ausgangswertes ab, dP/dt sank auf 84 % des ursprünglichen Wertes. Wie beim CPP zeigten sich auch hier die stärksten Veränderungen innerhalb der ersten 20 Minuten nach Toxinzugabe.

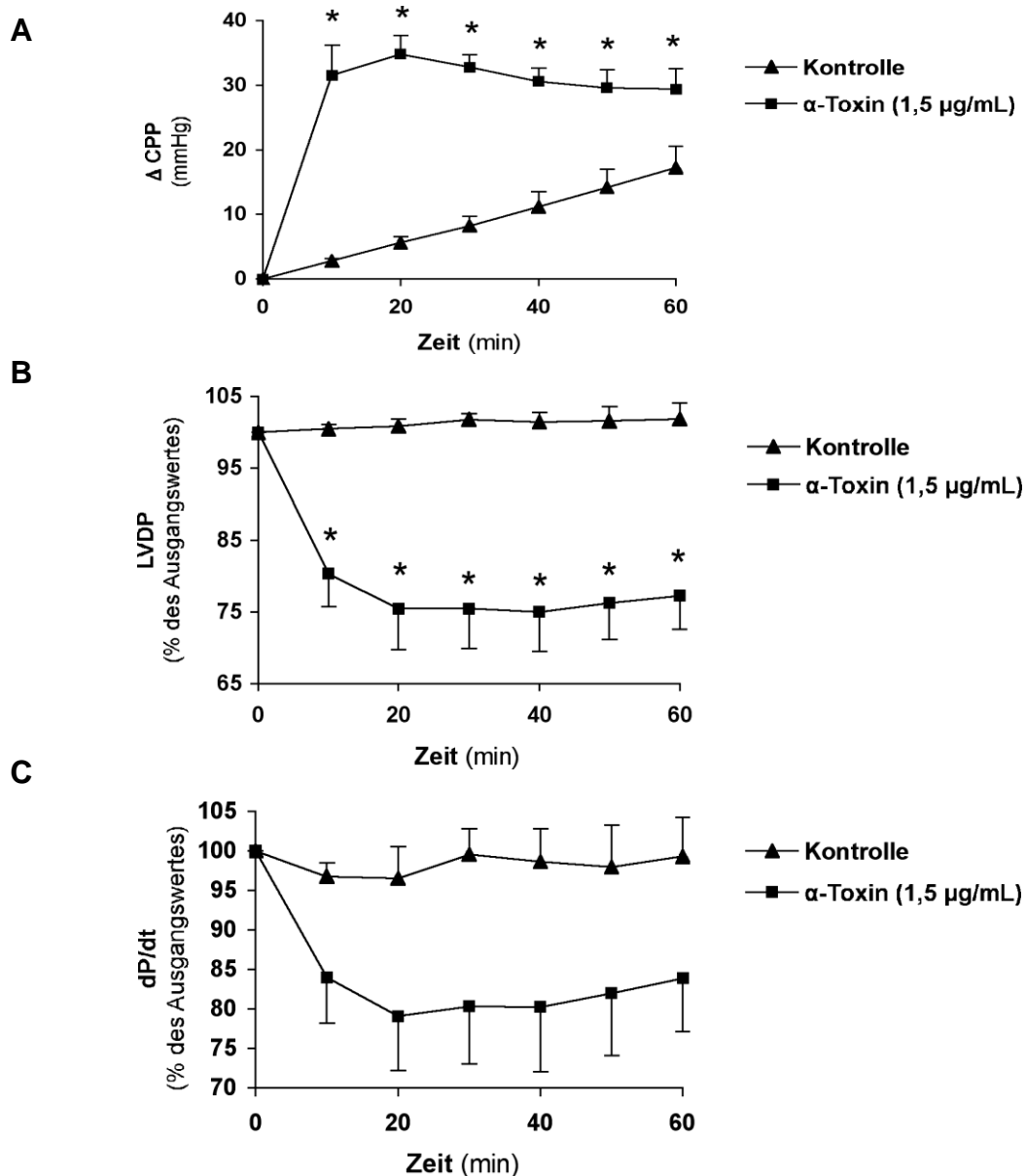


Abbildung 4-2: Auswirkungen von α-Toxin auf die Perfusion und Kontraktilität isoliert perfundierter Rattenherzen

α-Toxin wurde dem rezirkulierenden Perfusat in einer Endkonzentration von 1,5 µg/ml zugesetzt. Die Herzen wurden über einen Zeitraum von 60 Minuten perfundiert.

Diagramm A stellt den Anstieg des koronaren Perfusionsdruckes (CPP) als Abweichung des Ausgangswertes dar, Diagramm B den Abfall der linksventrikulären Kontraktilität (LVDP) und Diagramm C den Abfall der linksventrikulären maximalen Druckanstiegsgeschwindigkeit (dP/dt_{max}). Die in Diagramm B und C dargestellten Werte sind in Prozent des Ausgangswertes zur 0. Minute angegeben. Mit * markierte α-Toxinwerte unterscheiden sich signifikant ($p < 0.05$) von der Kontrolle.

4.2.3 Wirkung von LTA

Genau wie für α -Toxin konnte auch für den grampositiven Zellwandbestandteil LTA ein deutlicher kardiodepressiver Effekt auf das isoliert perfundierte Rattenherz nachgewiesen werden. Der Zusatz von LTA in einer Konzentration von 2 $\mu\text{g/ml}$ Perfusat bewirkte nach 180 Minuten eine starke Minderung der myokardialen Kontraktilität. Dies zeigte sich in einem Abfall des LVDP auf 72 % des Ausgangswertes innerhalb von 180 Minuten. Der steilste Abfall setzte hierbei etwa nach 120 bis 150 Minuten ein. Sehr ähnlich verhielt sich die maximale linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit ($\text{dP/dt}_{\text{max}}$), ebenfalls ein Parameter zur Beurteilung der Herzkontraktilität. Sie blieb bis etwa zur 120. Minute relativ konstant, sank dann jedoch rapide ab bis zu einem Endwert von 72 % des Ausgangswertes in der 180. Minute. Ein Einfluss von LTA auf die koronare Perfusion war auch nachzuweisen, er zeigte sich jedoch weniger ausgeprägt. Bis zur 150. Minute nach Zugabe von LTA stieg der CPP im Vergleich zur Kontrollgruppe nur um etwa 12 mmHg höher über den Ausgangswert, nach 180 Minuten lag er um 24 mmHg höher als der Wert der Kontrollgruppe.

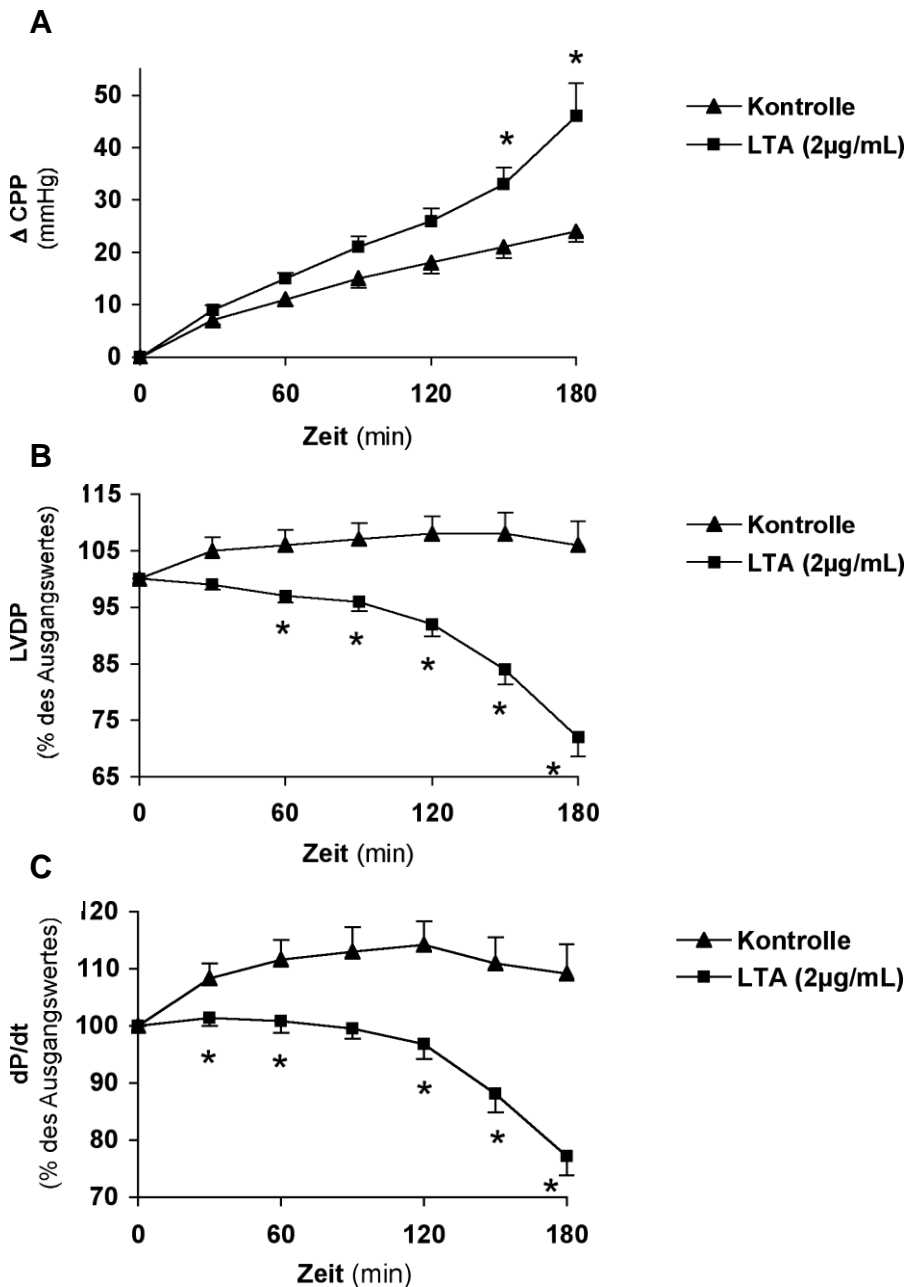


Abbildung 4-3: Auswirkungen von LTA auf die Perfusion und Kontraktilität isoliert perfundierter Rattenherzen

LTA wurde dem Perfusat in einer Konzentration von 2 μg/ml zugesetzt. Die Herzen wurden über einen Zeitraum von 180 Minuten perfundiert.

Diagramm A stellt den Anstieg des CPP als Abweichung des Ausgangswertes (0. Minute) dar. Diagramm B zeigt den prozentualen Verlauf des LVDP zum Ausgangswert, in Diagramm C ist der prozentuale Wert der dP/dt_{max} zum Ausgangswert dargestellt. Mit * markierte LTA-Werte unterscheiden sich signifikant ($p < 0.05$) von der Kontrolle.

4.3 Pharmakologische Intervention – Inhibition der PDE 5

Nachdem es gelungen war, die kardiodepressiven Effekte von α -Toxin und LTA am isoliert perfundierten Rattenherzen zu reproduzieren, wurden weitere Versuchsreihen durchgeführt, um eine mögliche Beeinflussung der toxininduzierten Kardiodepression durch Inhibition der PDE 5 nachzuweisen. Hierbei wurde, jeweils 10 Minuten vor Zugabe des entsprechenden Toxins, Sildenafil oder Zaprinast zur Vorbehandlung der Herzen in das rezirkulierende Perfusat gegeben. Bei α -Toxin-perfundierten Herzen wurden Sildenafil und Zaprinast jeweils in einer Konzentration von 10 μ M verwendet, die LTA perfundierten Herzen wurden mit 1 μ M Sildenafil, bzw. 4 μ M Zaprinast vorbehandelt.

Um ausschließen zu können, dass Sildenafil und Zaprinast nicht bereits alleine eine Veränderung der Herzparameter hervorrufen, wurden zuvor Kontrollversuchsreihen unter alleiniger Zugabe der PDE-Inhibitoren in verschiedenen Konzentrationen durchgeführt. Hierbei zeigten sich keine signifikanten Änderungen der Herzparameter (Daten hier nicht dargestellt).

4.3.1 Auswirkungen auf physiologische Parameter

4.3.1.1 PDE 5-Inhibition und α -Toxin

Durch die Zugabe von Sildenafil und Zaprinast konnte der kardiodepressive Effekt des α -Toxins deutlich abgeschwächt werden. Die stärksten Auswirkungen konnten für die Parameter der koronaren Perfusion nachgewiesen werden. Hierbei zeigte die α -Toxingruppe in Anwesenheit von Sildenafil einen annähernd gleichen Verlauf des CPP wie die Kontrollgruppe, und auch bei der α -Toxingruppe nach Vorbehandlung mit Zaprinast stieg der CPP nur um 20 \pm 1,8 mmHg, während er in der reinen Toxingruppe nach 20 Minuten bereits um 35 \pm 2,9 mmHg angestiegen war und sich bis zum Versuchsende bei einem etwa 30 \pm 2,8 mmHg oberhalb des Ausgangswertes liegenden Wert einpendelte. Der initiale Druckanstieg verlief in der mit Zaprinast vorbehandelten Toxingruppe mit 15 \pm 2,0 mmHg ebenfalls deutlich schwächer als bei der reinen Toxingruppe. Auch die myokardialen

4 Ergebnisse

Kontraktilitätsparameter sanken nach Zugabe eines PDE 5-Inhibitors weniger ab. Nach Sildenafil-Vorbehandlung fiel der LVDP α -Toxin-perfundierter Herzen nur auf etwa 90 \pm 4,3 % des Ausgangswertes, und auch nach Vorbehandlung mit Zaprinast fiel er nur auf 88 \pm 3,0 % des ursprünglichen Wertes zu Versuchsbeginn. Dies entspricht einer etwa 13- bzw. 11-prozentigen Verbesserung gegenüber der reinen α -Toxingruppe. Für die dP/dt_{\max} zeigte sich 20 Minuten nach Toxinzugabe die deutlichste Verbesserung. Sie sank hier in Anwesenheit von Sildenafil um ca. 10 % weniger ab als ohne PDE-Inhibition, in Anwesenheit von Zaprinast sogar um 12 % weniger. Nach einer Stunde lagen die Werte der mit Sildenafil bzw. Zaprinast vorbehandelten und anschliessend mit α -Toxin perfundierten Herzen auf annähernd gleicher Höhe wie nach 20 Minuten. Durch einen Anstieg der dP/dt_{\max} in der reinen Toxingruppe zwischen der 20. und 60. Minute konnte bei Versuchsende jedoch nur noch ein Unterschied von etwa 3 % zur Toxin/Sildenafilgruppe und ca. 6 % zur Toxin/Zaprinastgruppe verzeichnet werden.

4 Ergebnisse

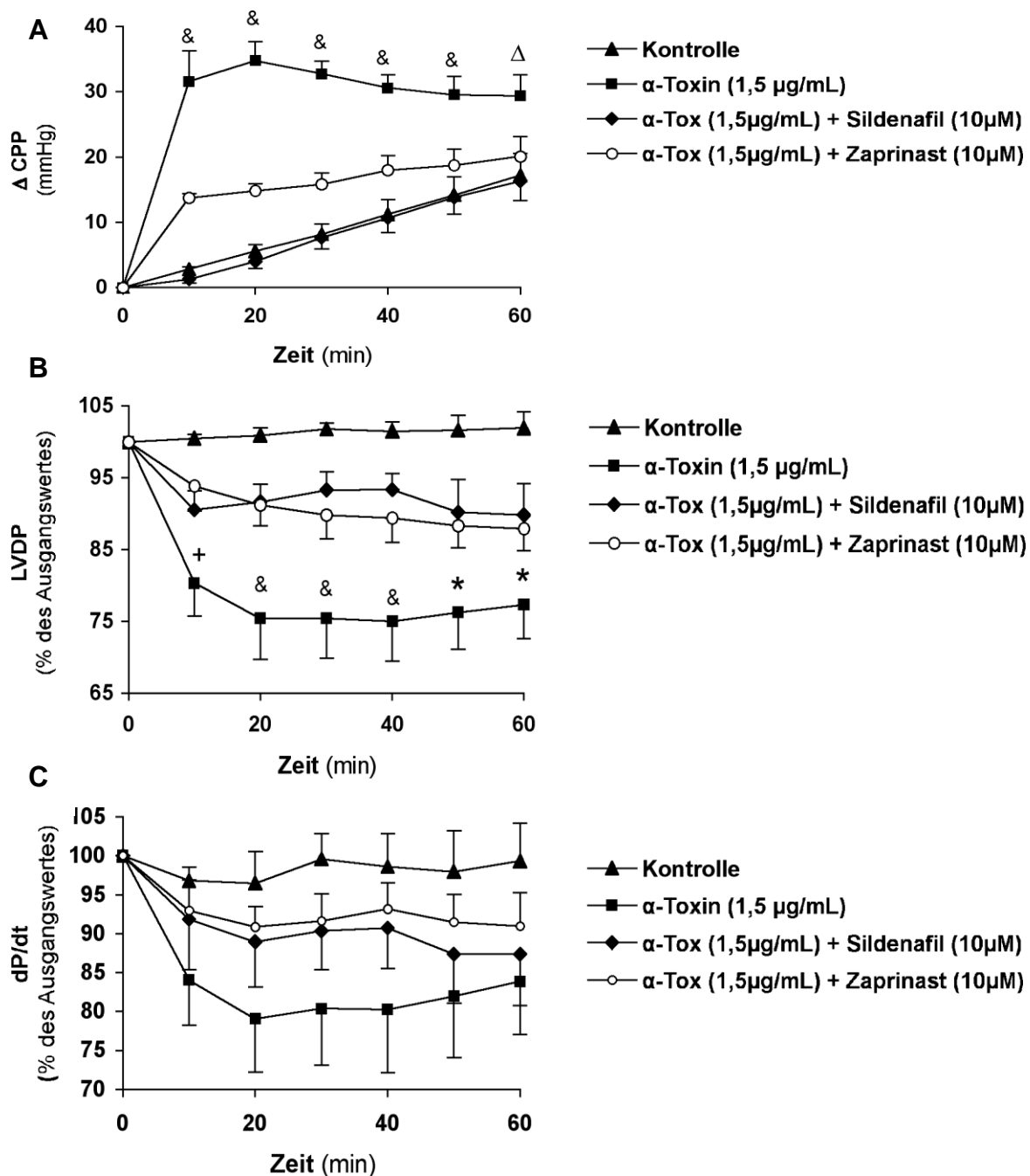


Abbildung 4-4: Auswirkungen der PDE 5-Inhibition auf physiologische Parameter α -Toxin-perfundierter Rattenherzen

Diagramm A zeigt den Verlauf des CPP als Abweichung des zu Versuchsbeginn ermittelten Ausgangswertes an. In Diagramm B ist der prozentuale Verlauf des LVDP dargestellt, Diagramm C beschreibt, ebenfalls prozentual, den Verlauf der dP/dt_{max} . Die markierten Werte unterscheiden sich signifikant ($p < 0.05$) von der Kontrollgruppe (*), der Kontroll- und der Sildenafil-Toxingruppe (Δ), der Kontroll- und der Zaprinast-Toxingruppe (+) oder von allen 3 Vergleichsgruppen (&).

4.3.1.2 PDE 5-Inhibition und LTA

Im Anschluss an die Versuchsreihen zur Untersuchung der Beeinflussung einer α -Toxin induzierten Kardiodepression durch PDE 5-Inhibitoren wurde der Einfluss dieser Phosphodiesterasehemmer auf die LTA-induzierten myokardialen Kontraktilitäts- und Perfusionsänderungen untersucht.

Es zeigte sich hierbei, dass durch die Zugabe von Sildenafil, die Beeinträchtigung der Herzfunktion durch LTA deutlich abgeschwächt werden konnte. Die ermittelten Werte für den CPP sowie den LVDP entsprachen nahezu denen der toxinfrei perfundierten Kontrollgruppe. Der toxininduzierte Anstieg des CPP lag in Anwesenheit von Sildenafil nach 180 Minuten $25 \pm 3,1$ mmHg über dem Ausgangswert, in der Kontrollgruppe lag er $24 \pm 2,1$ mmHg darüber. Für den LVDP konnte in beiden Gruppen nach 3 Stunden ein um $5 \pm 4,0$ % höherer Wert als zu Versuchsbeginn ermittelt werden. Auch der dP/dt_{\max} -Graph der mit Sildenafil vorbehandelten LTA-Gruppe verlief ähnlich wie der der Kontrollgruppe, wobei die Werte im Schnitt um 4-5 % tiefer lagen. Nach 180 Minuten wurde in beiden Gruppen für die dP/dt_{\max} , mit $107 \pm 6,1$ % für Sildenafil/LTA, bzw. $109 \pm 5,2$ % für LTA allein, ein Wert oberhalb des Ausgangswertes ermittelt.

Analog dazu zeigte sich, dass auch der PDE 5-Inhibitor Zaprinast in der Lage ist, die negativ inotrope Wirkung von LTA sowie deren vasokonstriktorisches Effekt auf die Koronargefäße teilweise aufzuheben. So stieg der CPP unter Zaprinast-Vorbehandlung innerhalb von 180 Minuten annähernd linear nur 31 ± 4 mmHg, in der reinen Toxingruppe verlief er bis zur 120. Minute fast parallel, stieg anschließend jedoch etwas steiler an und schloss $46 \pm 6,2$ mmHg oberhalb seines Ausgangswertes. Ein deutlicherer Unterschied konnte für den Verlauf des LVDP und der dP/dt_{\max} nachgewiesen werden: In beiden Graphen zeigte sich bei Zaprinastzugabe, initial nach Toxinapplikation, eine minimale Verbesserung der Inotropie, welche in der reinen Toxingruppe völlig ausblieb oder schwächer ausgeprägt war. Im weiteren Versuchsverlauf verhinderte Zaprinast den etwa nach 120 Minuten einsetzenden steilen Abfall des LVDP sowie der dP/dt_{\max} . In der 180. Minute lag der LVDP der LTA/ Zaprinastgruppe nur 6 % unterhalb seines Ausgangswertes, was einer Verbesserung gegenüber der reinen Toxingruppe um etwa 22 % entsprach. Die dP/dt_{\max} lag bei Versuchsende mit $98 \pm 4,8$ % in der LTA/ Zaprinastgruppe ebenfalls deutlich über dem Wert der reinen Toxingruppe, welche mit $77 \pm 3,4$ % des Ausgangswertes abschloss.

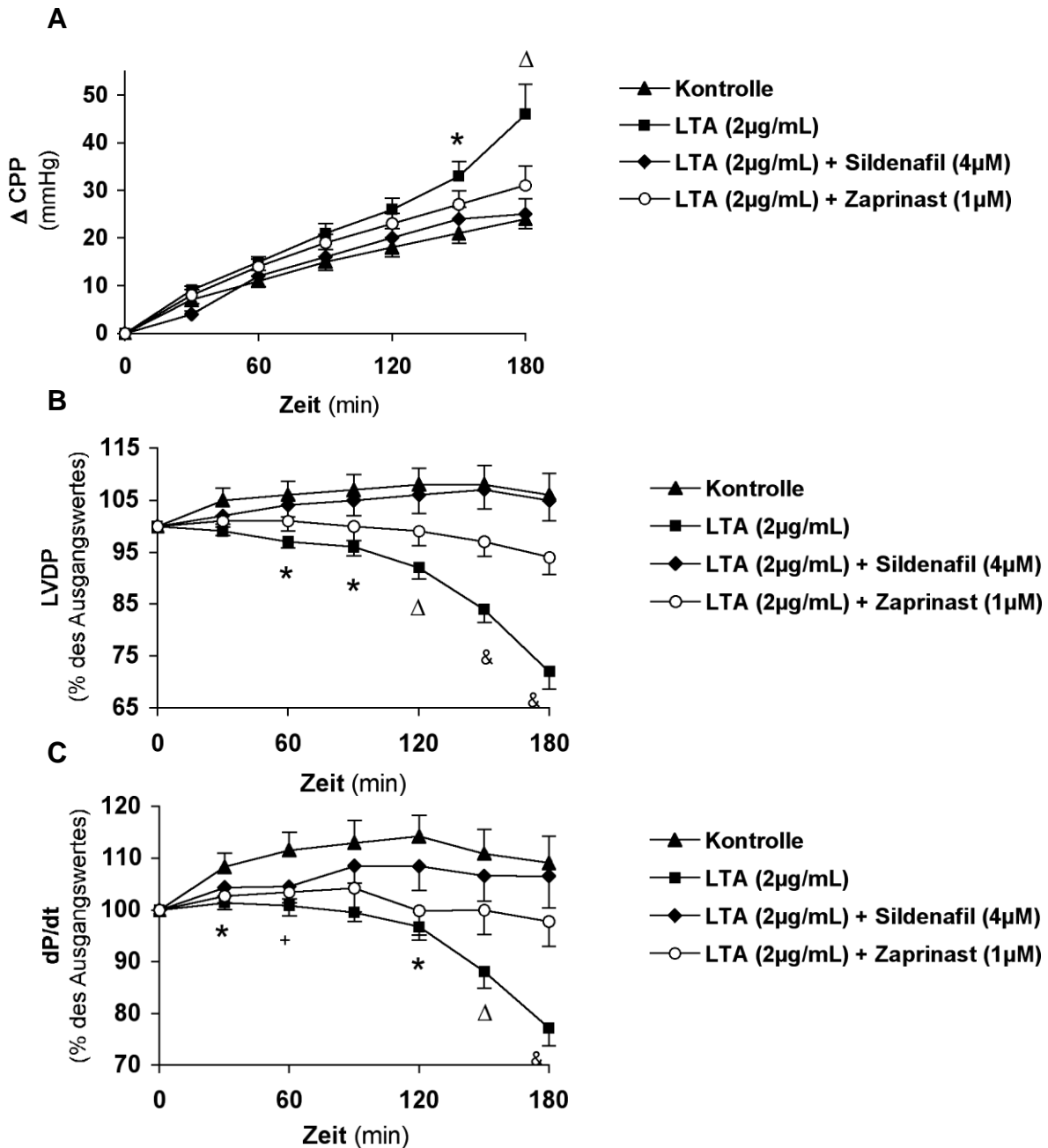


Abbildung 4-5: Auswirkungen der PDE 5-Inhibition auf physiologische Parameter LTA-perfundierter Rattenherzen

Diagramm A zeigt den Verlauf des koronaren Perfusionsdruckes als Abweichung des Ausgangswertes. In Diagramm B wird der prozentuale Verlauf des LVDP dargestellt, und Diagramm C zeigt prozentual den Verlauf der dP/dt_{max} . Die markierten Werte unterscheiden sich signifikant ($p < 0.05$) von der Kontrolle (*), der Kontrolle und der Sildenafil-Toxinggruppe (Δ), der Kontrolle und der Zaprinast-Toxinggruppe (+) oder allen 3 Vergleichsgruppen (&).

4.4 Analyse der Perfusatproben auf vasoaktive Mediatoren

4.4.1 Modulation der Thromboxanfreisetzung

Um die mögliche pathophysiologische Bedeutung von TxA_2 bei der toxininduzierten kardialen Dysfunktion zu untersuchen, wurde die Freisetzung von TxB_2 , dem stabilen, inaktiven Hydrolyseprodukt des vasokonstriktors TxA_2 in das Perfusat bestimmt. Hierzu erfolgte mittels ELISA eine Analyse der während der Versuchsreihen zum Zeitpunkt 0.-, 5.-, 10.-, 20.-, 40.- und 60. Minute genommenen Perfusatproben, welche bis zum Untersuchungszeitpunkt bei $-20^\circ \text{ Celsius}$ gelagert wurden.

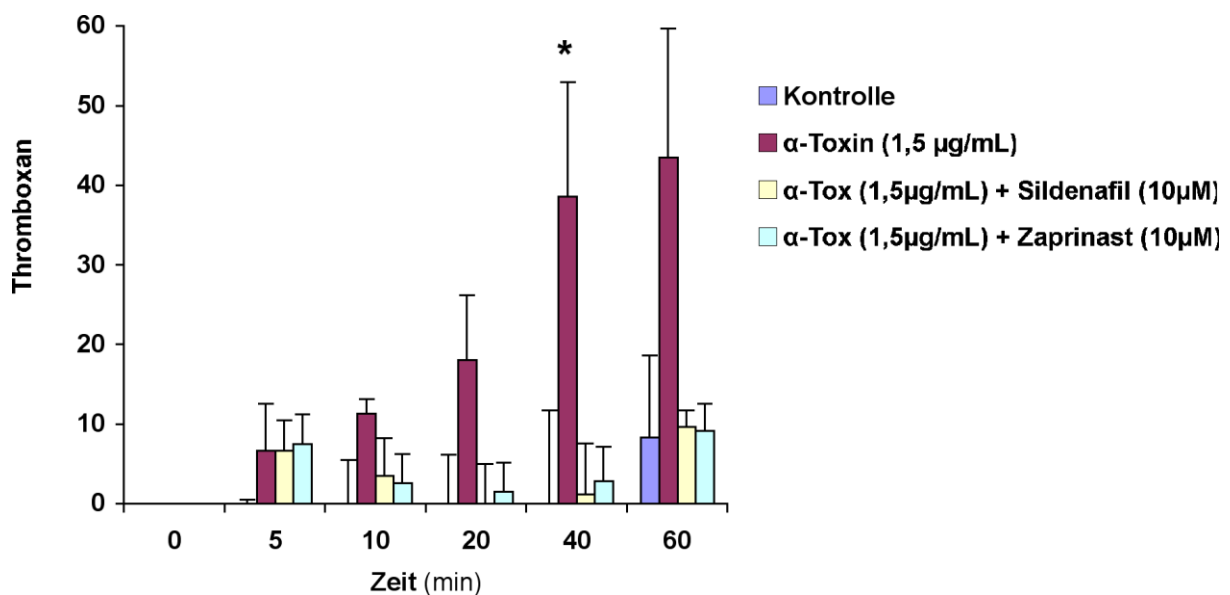


Abbildung 4-6: Freisetzung von Thromboxan nach Applikation von α -Toxin mit und ohne PDE-Inhibition im Vergleich zur toxinfrei perfundierten Kontrollgruppe

Der mit * markierte Wert unterscheidet sich signifikant von der Kontrolle sowie der mit α -Toxin bzw. Zaprinast vorbehandelten Toxingruppe.

Während in der Kontrollgruppe erst nach der 40. Versuchsminute ein erhöhter TxB₂-Spiegel nachgewiesen werden konnte, zeigte sich in der Toxingruppe bereits nach 5 Minuten ein erhöhter TxB₂-Wert, verglichen mit dem Ausgangswert zu Beginn des Versuches. Der Wert stieg innerhalb von 5 Minuten um 7 pg/ml, in der Kontrollgruppe stieg er innerhalb von 60 Minuten um 8 pg/ml. In Anwesenheit von Sildenafil bzw. Zaprinast zeigte sich ebenfalls ein Anstieg der TxB₂-Konzentration um 7 bzw. 8 pg/ml innerhalb der ersten 5 Minuten, genau wie bei der reinen Toxingruppe. Im weiteren Verlauf kam es jedoch in Anwesenheit der PDE-Inhibitoren zu keinem weiteren Anstieg der TxB₂-Konzentration, und sie endeten bei einem Wert von 10 pg/ml für die α -Toxin/Sildenafilgruppe und 9 pg/ml für die α -Toxin/Zaprinastgruppe in der 60. Minute. Für die reine Toxingruppe konnte während des gesamten Versuchsverlaufes ein steigender Spiegel an TxB₂, und mit 43 pg/ml in der 60. Minute ein weit höherer Wert als in den Vergleichsgruppen nachgewiesen werden.

4.4.2 Modulation der TNF-Freisetzung

Bei den LTA-Versuchsreihen wurden ebenfalls Perfusatsproben genommen, jedoch zu den Zeitpunkten 0., 60., 150. und 180. Minute. Später erfolgte ebenfalls eine Analyse mittels ELISA zur Bestimmung des vasoaktiven Mediators TNF- α . Bis zum Untersuchungszeitpunkt erfolgte die Lagerung der Proben bei -80 °C.

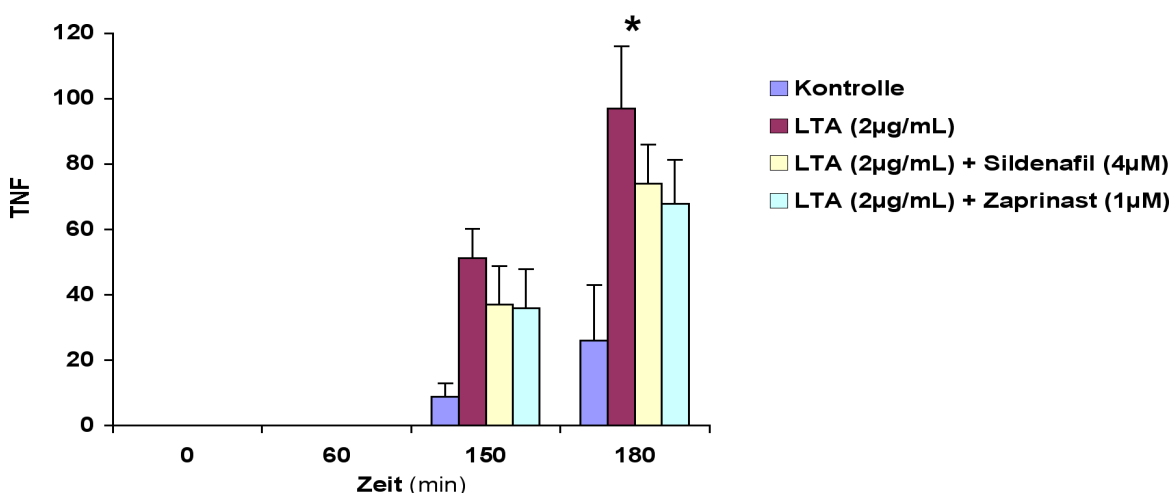


Abbildung 4-7: Freisetzung von TNF- α nach Applikation von α -Toxin mit und ohne PDE-Inhibition im Vergleich zur toxfrei perfundierten Kontrollgruppe

Der mit * markierte Wert unterscheidet sich signifikant von dem der Kontrollgruppe.

4 Ergebnisse

Bei allen 4 Untersuchungsgruppen konnte zum Zeitpunkt 0. und 60. Minute kein TNF- α im Perfusat nachgewiesen werden. Nach 150 Minuten lag die TNF- α -Konzentration in der Kontrollgruppe lediglich bei 9 pg/ml, während sie in der Toxingruppe schon bei 51,3 pg/ml lag. Die Konzentrationen bei der mit Sildenafil bzw. Zaprinast vorbehandelten LTA-Gruppe lagen mit 37 bzw. 36 pg/ml deutlich unterhalb der Werte der reinen Toxingruppe. Ein im Verhältnis ähnliches Ergebnis zeigte sich bei der Untersuchung der während der 180. Minute genommenen Proben. Hier lag der TNF- α -Wert der Kontrollgruppe bei 26 pg/ml, der der LTA-Gruppe bei 96,9 pg/ml. Die Werte der LTA/Sildenafilgruppe sowie der LTA/Zaprinastgruppe lagen mit 74 bzw. 68 pg/ml wiederum unterhalb derer der reinen Toxingruppe.

Die Perfusion von Sildenafil oder Zaprinast in Abwesenheit von LTA hatte keinen Einfluss auf die TNF-Freisetzung (Daten hier nicht dargestellt).

5 Diskussion

5.1 Entwicklung der Fragestellung

5.1.1 Pathophysiologische Veränderungen der septischen Kardiomyopathie

Die Sepsis und der septische Schock stellen unverändert eine große therapeutische Herausforderung in der modernen Intensivmedizin dar. Durch die Einschwemmung von Erregern, ihrer Toxine oder Zellwandbestandteile aus einem entzündlichen Fokus, wird im Wirtsorganismus eine Kaskade verschiedener inflammatorischer Reaktionen ausgelöst. So kommt es beispielsweise zur Aktivierung des Komplement- und Gerinnungssystems, zur Freisetzung von Zytokinen, wie $\text{TNF-}\alpha$ oder $\text{IL-1}\beta$ sowie vasoaktiver Mediatoren, wie PAF, NO oder verschiedenen Arachidonsäuremetaboliten [6]. Diese systemische Wirtsreaktion wird auch durch den Begriff SIRS zusammengefasst. Hauptfolge dieser systemischen Entzündungsreaktion ist die Beeinträchtigung der Makro- und Mikrozirkulation, was zu Gewebeschädigung, septischem Organversagen und septischem Schock führen kann [7][8].

Da während des septischen Schocks das HZV meist über einen längeren Zeitraum unverändert oder sogar erhöht ist, wurde die Beeinträchtigung der Herzfunktion im Rahmen der Sepsis lange Zeit unterschätzt. Hierbei wurde jedoch nicht beachtet, dass die Steigerung des HZV gegenüber dem massiven peripheren Widerstandsabfall zumeist völlig unzureichend ist. Heute weiß man, dass sogar Todesfälle im septischen Schock auf ein Pumpversagen des Herzens zurückzuführen sind [8]. Diese Beeinträchtigung der Herzfunktion ist heute unter dem Begriff der septischen Kardiomyopathie bekannt. Pathophysiologisch kennzeichnend hierfür ist eine Dilatation beider Ventrikel mit verminderten Auswurffractionen. Durch einen Anstieg der HF bei sinkendem peripherem Widerstand ist das HZV häufig erhöht, der Blutdruckabfall im septischen Schock ist meist jedoch nicht kompensiert [14][15]. Zusätzlich verhindert eine erhöhte Ventrikelcompliance während des septischen Geschehens eine mögliche adäquate Steigerung der kardialen Leistung durch die in der Sepsis obligate

Volumensubstitution [17]. Ein veränderter O₂-Bedarf der Herzmuskelzellen, zusammen mit der gestörten koronaren Vasomotorik, führt schließlich zu einem Missverhältnis zwischen O₂-Angebot und O₂-Bedarf, was sich wiederum negativ auf die Pumpleistung auswirkt [18].

Man weiß heute, dass die schädigende Wirkung auf den Herzmuskel durch verschiedene Substanzen, die sogenannten „Myocardial depressant substances“, ausgelöst wird [27][29]. Zu diesen zählen vor allem Zytokine wie TNF- α und IL-1 β . Sie haben einen direkt negativ inotropen Effekt. Diese Wirkung konnte an isolierten Kardiomyozyten und auch in klinischen Studien belegt werden [31][32][33]. Derzeit werden noch verschiedene molekulare Mechanismen diskutiert, welche der Kardiodepression zugrunde liegen könnten. Zum einen besteht die Möglichkeit, dass eine verminderte Ca²⁺-Freisetzung in das Zytoplasma oder ein vermindertes Ansprechen der Myofilamente auf intrazellulär freigesetztes Ca²⁺ ursächlich für die abgeschwächte Kontraktilität [34][35][165] ist, zum anderen könnten komplexere Abläufe, welche die Neusynthese verschiedener Proteine beinhalten, von Bedeutung sein [166][167].

Ebenso wird verschiedenen vasoaktiven Substanzen, wie NO und diversen Cyclo- und Lipoxxygenaseprodukten eine bedeutende Rolle bei der Entstehung sepsisassoziierter kardialer Funktionsstörungen zugeschrieben [87][168][169][170][171][172][173]. Man vermutet heute, dass diese vasoaktiven Substanzen an der Entstehung von Mikrozirkulationsstörungen im Myokard beteiligt sein könnten. Derartige Mikrozirkulationsstörungen treten in der Sepsis in vielen Organen, wie z.B. der Lunge, dem Darm oder dem Skelettmuskel auf. Im Herzen könnten Mikrozirkulationsstörungen zu einer Störung der Pumpfunktion führen. So könnte die Freisetzung vasoaktiver Mediatoren im Myokard zu einem Nebeneinander von hypo- und hyperperfundierten Gewebearealen führen, welches, auch ohne Vorliegen einer globalen Hypoperfusion des Herzens, zu einem relevanten Rückgang der Pumpfunktion führen könnte. In den letzten Jahren hat sich gezeigt, dass die kardiodepressiven und vasoaktiven Eigenschaften von NO sowie seinem intrazellulären Signaltransduktionsweg, der vor allem cGMP und die cGMP-hydrolysierenden PDEs beinhaltet, maßgeblich daran beteiligt sein könnte [76][174][175][176]. In experimentellen und klinischen Untersuchungen der letzten Jahre konnte gezeigt werden, dass PDE-Inhibitoren bei der Therapie verschiedener Krankheitsbilder, wie der pulmonalen Hypertonie, der Herzinsuffizienz sowie bei Ischämie-Reperfusionsschäden des Herzens eingesetzt werden können [156][159][160][161][162][163].

5.1.2 Bedeutung der bakteriellen Pathogenitätsfaktoren α -Toxin und LTA bei der Entstehung der Sepsis

Eine Sepsis ist gekennzeichnet durch die systemische hämatogene Aussaat eines Erregers selbst oder seiner Pathogenitätsfaktoren. Das Bakterium *Staphylococcus aureus* bildet das α -Toxin, welches als Prototyp Poren bildender Exotoxine gilt. Verschiedene Zellen des Organismus zeigen nach Kontakt mit α -Toxin spezifische Reaktionen: Humane Monozyten setzen beispielsweise die proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IL- β frei [177]. Endothelzellen reagieren mit der Freisetzung vasoaktiver Substanzen, wie NO, PAF oder Prostacyclin. Infolge einer anschließenden interzellulären Lückenbildung durch die direkte Wirkung von α -Toxin oder z.B. α -Toxin-aktiviertem Prostacyclin wird die endotheliale Permeabilität stark erhöht [178][179][180]. Durch eine Aktivierung von Thrombozyten fördert α -Toxin die humane Blutgerinnung [181], im Tierversuch verursacht eine intravenöse α -Toxin Bolusinjektion ein akutes Herzversagen [107], und an isoliert perfundierten Kaninchenlungen löst α -Toxin eine pulmonale Hypertonie mit endothelialer Schrankenfunktionsstörung und Ausbildung eines Lungenödems aus [105][106]. Die Ergebnisse dieser experimentellen Untersuchungen zeigen eindeutig die pathophysiologische Relevanz dieses Exotoxins bei der Entstehung septischer Krankheitsbilder. Zudem konnte am isoliert perfundierten Rattenherzen gezeigt werden, dass α -Toxin durch Aktivierung der Thromboxanbildung eine kardiale Dysfunktion auslöst. Diese kardiale Dysfunktion steht aller Wahrscheinlichkeit nach mit der Induktion Thromboxan-abhängiger Mikrozirkulationsstörungen im Herzen in Zusammenhang, welche durch eine Blockade der kardialen NO-Synthetase sogar noch verstärkt werden [76].

Neben den Exotoxinen spielen auch die Endotoxine und ihre grampositiven Äquivalente, wie beispielsweise LTA von *Staphylococcus aureus*, bei der Entstehung septischer Krankheitsbilder eine bedeutende Rolle. Heute ist bekannt, dass LTA die Zytokinfreisetzung von Monozyten und Makrophagen stimuliert [116][117][118]. Mit Hilfe des Ganztiermodells konnte gezeigt werden, dass LTA Auslöser eines septischen Schocks mit Multiorganversagen sein kann [120][121]. An isoliert perfundierten Rattenherzen konnte eine durch LTA verursachte Störung der Kontraktilität nachgewiesen werden [125]. Interessanterweise konnte

diese Kontraktilitätsstörung auf die LTA-induzierte Bildung von kardiodepressiv wirkendem TNF- α im Myokard zurückgeführt werden.

Vor diesem Hintergrund wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, inwieweit sich die α -Toxin- und LTA-induzierte Kardiodepression am isoliert perfundierten Rattenherzen durch pharmakologische Inhibition der PDE 5 modulieren lässt. Darüber hinaus sollten die hierbei beteiligten pathophysiologischen Mechanismen näher untersucht werden.

5.2 *Staphylococcus aureus* α -Toxin und LTA rufen durch die Bildung von Entzündungsmediatoren eine Kardiodepression an isoliert perfundierten Rattenherzen hervor

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten die kardiodepressiven Effekte der gereinigten Bakterientoxine α -Toxin und LTA auf isoliert perfundierte Rattenherzen zunächst bestätigt werden.

Die Perfusion von isoliertem α -Toxin führte zu einer Zunahme des koronaren Perfusionsdruckes, als Ausdruck eines erhöhten koronaren Gefäßwiderstandes, und parallel hierzu zu einem Rückgang der linksventrikulären Pumpfunktion. Die Analysen der Perfusatproben, welche während der Versuchsabläufe asserviert wurden, zeigten, dass der myokardiale Kontraktilitätsabfall von einer Freisetzung von TxA₂ begleitet war, welche anhand der Akkumulation des stabilen Hydrolyseproduktes TxB₂ zweifelsfrei nachweisbar war. Diese Ergebnisse stehen vollständig im Einklang mit früheren Untersuchungen, in denen gezeigt werden konnte, dass *S. aureus* α -Toxin am isoliert perfundierten Rattenherzen die Bildung von Thromboxan induziert, was wiederum zu einer Zunahme des koronaren Gefäßwiderstandes, und somit zu einem Anstieg des koronaren Perfusionsdruckes führt [76]. Auch in dieser früheren Untersuchung war die toxin-induzierte Perfusionsstörung mit einer gleichzeitigen Abnahme der linksventrikulären Pumpfunktion verbunden. Interessanterweise konnte in dieser Untersuchung durch pharmakologische Interventionen mit einem Cyclooxygenaseinhibitor und einem Thromboxanrezeptor-Antagonisten gezeigt werden, dass der Abfall der Kontraktilität durch die toxin-aktivierte Thromboxan-Bildung hervorgerufen worden war und nicht durch einen unspezifischen zytotoxischen Toxineffekt. Dies ist insofern

bemerkenswert, da Thromboxan selbst keine negativ inotropen Eigenschaften aufweist. Die wahrscheinlichste Erklärung für die Thromboxan-vermittelte Kardiodepression in α -Toxin-perfundierten Herzen bestand darin, dass das vermehrt gebildete Thromboxan zu Störungen der kardialen Mikrozirkulation geführt hatte, in Folge derer es zu Störungen der Pumpfunktion gekommen war. Die gesamten Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sprechen dafür, dass die nachgewiesene Toxin-aktivierte TxA_2 -Bildung und kein unspezifischer toxischer Effekt des α -Toxins die beobachteten Störungen der koronaren Perfusion sowie myokardialen Pumpfunktion in α -Toxin-perfundierten Rattenherzen hervorgerufen hat.

Ähnliche Effekte konnten in den aktuellen Untersuchungen durch die koronare Perfusion isolierter LTA am selben Modell beobachtet werden. Die Perfusion von LTA führte, im Gegensatz zu α -Toxin jedoch erst nach einer Latenz von etwa 90 Minuten, ebenfalls zu einem Rückgang der Kontraktilität in Form eines Abfalls des LVDP und der dP/dt sowie zu einer mäßigen Vasokonstriktion mit steigendem koronarem Perfusionsdruck. Im Falle von LTA konnte im rezirkulierenden Perfusat der isolierten Rattenherzen eine Zunahme der $\text{TNF-}\alpha$ -Freisetzung nachgewiesen werden. Auch diese Ergebnisse bestätigen eine weitere frühere Untersuchung, in der gezeigt werden konnte, dass die LTA-induzierte Freisetzung von $\text{TNF-}\alpha$ für die Kardiodepression im Modell des isoliert perfundierten Rattenherzens verantwortlich ist [125]. In dieser Arbeit konnte die durch LTA hervorgerufene Kardiodepression durch Zugabe eines neutralisierenden $\text{TNF-}\alpha$ -Antiköpers größtenteils verhindert werden.

Die in der vorliegenden Untersuchung beobachteten Veränderungen der physiologischen Herzparameter waren eindeutig ausschließlich auf die Perfusion von α -Toxin bzw. LTA zurückzuführen und nicht auf vermeintliche Endotoxinkontaminationen, da für alle Versuche stets gereinigte und sterilisierte Schlauchsysteme sowie Gefäße verwendet wurden. Darüber hinaus ließen sich mit Hilfe eines Limulus-Tests keine Verunreinigungen der LTA, des α -Toxins und des Perfusats mit LPS nachweisen. Den stärksten Hinweis auf die pathophysiologische Relevanz der Bakterientoxine gaben jedoch die Kontrollversuche, in denen es in Abwesenheit der Toxine zu keinerlei kardialen Funktionsstörungen mit Freisetzung von TxA_2 oder $\text{TNF-}\alpha$ kam.

5.3 PDE 5-Inhibitoren zeigen eine protektive Wirkung im Modell der α -Toxin- und LTA-induzierten Kardiodepression

Die entscheidenden Befunde der vorliegenden Arbeit bestanden darin, dass sich die kardiodepressiven Eigenschaften von sowohl α -Toxin als auch LTA durch Inhibition der PDE 5 deutlich abschwächen ließen. Dass es sich hierbei um für die Substanzgruppe der PDE 5-Inhibitoren spezifische Effekte handeln muss, ist nahe liegend, da sich diese Auswirkungen sowohl an α -Toxin- als auch LTA-perfundierten Herzen in Anwesenheit von sowohl Zaprinast als auch Sildenafil nachweisen ließen. Ein möglicher Erklärungsansatz für die abgeschwächte kardiodepressive Potenz der Bakterientoxine in Anwesenheit der PDE-Inhibitoren könnten mutmaßliche positiv inotrope Effekte dieser Pharmaka darstellen. Es ist jedoch auszuschließen, dass mögliche positiv inotrope Eigenschaften der verwendeten PDE 5-Inhibitoren die α -Toxin- oder LTA-induzierte Kardiodepression abgeschwächt haben. Zum einen wird die kardiale Kontraktilität vor allem durch cAMP- und nicht durch cGMP-Spiegel reguliert, zum anderen wurde vor kurzem belegt, dass Sildenafil keinen Einfluss auf die Kontraktilität auf Herzmuskelgewebe hat [182]. Darüber hinaus blieb die Kontraktilität durch Perfusion von Zaprinast und Sildenafil in Abwesenheit der Toxine unbeeinflusst. Allein aus diesen Gründen ist es höchst wahrscheinlich, dass beide PDE-Inhibitoren in die mediatorvermittelte toxin-aktivierte Kaskade spezifisch eingreifen.

Da es im Falle von α -Toxin zu einem deutlich geringeren Toxin-aktivierten Anstieg des CPP in Anwesenheit eines PDE 5-Inhibitors im Vergleich zur alleinigen Toxinperfusion kam, und der assoziierte Rückgang der linksventrikulären Kontraktilität ebenfalls deutlich abgeschwächt war, wurde die Toxin-aktivierte TxA_2 -Freisetzung unter diesen Bedingungen bestimmt. Interessanterweise war auch die durch α -Toxin normalerweise hervorgerufene Freisetzung von TxA_2 in Anwesenheit beider Inhibitoren drastisch herabgesetzt. Aus den vorliegenden Untersuchungen lässt sich der genaue physiologische Mechanismus dieser „kardioprotektiven“ Eigenschaft der PDE 5-Inhibitoren im Zusammenhang mit α -Toxin nicht eindeutig klären. Die vorliegenden Daten suggerieren jedoch, dass der durch Inhibition der PDE 5 hervorgerufene Rückgang der TxA_2 -Bildung den zentralen kardioprotektiven Mechanismus im Falle der α -Toxin-induzierten Kardiodepression darstellen könnte. Auf molekularer Ebene könnte die Aktivierung der cGMP-abhängigen Proteinkinase G (PKG)

eine Erklärung für die beobachteten Effekte darstellen. Wie in einer aktuellen Untersuchung gezeigt werden konnte, führt die Inhibition der PDE 5 zur Aktivierung der PKG. Die aktivierte PKG wiederum könnte durchaus den Arachidonsäurestoffwechsel beeinflussen [183]. Zudem wurde vor kurzem gezeigt, dass die durch erhöhte cGMP-Spiegel aktivierte PKG auch die TNF- α - und die Thromboxan A₂-vermittelte Signaltransduktion beeinflusst [184].

Eine weitere, jedoch „thromboxan-unabhängige“ Erklärung für die beobachtete Kardioprotektion könnte darin bestehen, dass es durch Inhibition der PDE 5 zu einem verzögerten Abbau von cGMP, dem Second-messenger von NO, und somit zu einer Verstärkung der vasodilatierenden Wirkung von NO kommen könnte. Auf Intensität und Dauer der NO-induzierten Vasorelaxation nimmt die PDE 5 im kardiovaskulären System nämlich erheblichen Einfluss [185]. Eine gesteigerte Wirkung des vasodilatierenden NO könnte in der vorliegenden Untersuchung die Thromboxan-vermittelte Vasokonstriktion abgeschwächt haben, was wiederum zu einer Abschwächung der α -Toxin-induzierten Perfusionsstörungen und dem damit assoziierten Kontraktilitätsverlust geführt haben könnte. Diese Hypothese wird durch eine frühere Arbeit am selben experimentellen Modell des isolierten Rattenherzens unterstützt, in der gezeigt werden konnte, dass durch Inhibition der NOS die durch α -Toxin hervorgerufene Kardiodepression deutlich aggraviert werden kann. Dieses Phänomen wurde in dieser früheren Untersuchung dadurch erklärt, dass α -Toxin nicht nur die TxA₂- sondern auch die basale kardiale NO-Bildung erheblich steigert. In dieser Untersuchung wurde argumentiert, dass durch Inhibition der NO-Bildung die deletäre Wirkung von TxA₂ vollständig demaskiert wurde [186].

Auch wenn sich die durch LTA hervorgerufene kardiale Dysfunktion ebenfalls durch beide PDE 5-Inhibitoren attenuieren ließ, können die genauen Mechanismen ebenfalls nicht abschließend geklärt werden. Einen wichtigen Befund könnte allerdings die Tatsache darstellen, dass LTA, wie nicht nur in der vorliegenden Arbeit belegt, zur myokardialen TNF- α -Bildung führt. So konnte vor einiger Zeit gezeigt werden, dass LTA auch eine Freisetzung von TxA₂ an isolierten Rattenherzen hervorruft (125). Auch wenn die Bedeutung dieser TxA₂-Freisetzung noch nicht in letzter Konsequenz untersucht ist, könnte TxA₂ auch hier myokardiale Perfusionsstörungen induzieren, welche in den vorliegenden Untersuchungen einen Stimulus für die Freisetzung von TNF- α darstellen könnten [187]. Auch in diesem Falle

könnte es durch Inhibition der PDE 5 zu einem geringeren cGMP-Abbau und damit zu einer verstärkten Wirkung von kardialen NO gekommen sein. Dadurch könnte in letzter Konsequenz die TxA₂-Wirkung zumindest partiell antagonisiert werden, so dass es nur zu einer geringeren Stimulation der TNF- α -Bildung gekommen sein könnte. Selbstverständlich ist auch denkbar, dass, wie bereits oben angeführt, die durch erhöhte cGMP-Spiegel aktivierte PKG auch die TNF- α -vermittelte Signaltransduktion beeinflusst [184].

5.4 Mögliche klinische Relevanz der Ergebnisse

Die Sepsis zählt seit Jahren zu den häufigsten Todesursachen in der modernen Intensivmedizin. Die hohe Letalität der Sepsis wird vor allem durch ihre schwerwiegenden Organkomplikationen hervorgerufen. Hier ist insbesondere der septische Schock als Folge der kardiozirkulatorischen Veränderungen der Sepsis zu nennen. Der septische Schock ist nicht nur Folge der generalisierten Vasodilatation in der Sepsis, sondern wird zusätzlich durch eine in der Sepsis auftretende kardiale Dysfunktion erheblich aggraviert („Septische Kardiomyopathie“).

Wie inzwischen bekannt ist, wird die septische Kardiomyopathie durch die Wirkung unterschiedlicher Entzündungsmediatoren hervorgerufen, deren Spiegel in der Sepsis erhöht sein können. Besondere Bedeutung kommt dem kardiodepressiven TNF- α zu, aber auch vasoaktive Metabolite wie das TxA₂, welche zu Störungen der koronaren Zirkulation führen können, sind in diesem Kontext von Bedeutung.

In der vorliegenden Arbeit konnte belegt werden, dass die bakteriellen Toxine α -Toxin und LTA von *Staphylococcus aureus* im experimentellen Modell des isolierten Rattenherzens eine kardiale Dysfunktion durch Freisetzung von TxA₂ und TNF hervorrufen, welche durch die Zugabe der PDE-Inhibitoren Sildenafil und Zaprinast deutlich abgeschwächt werden konnten.

Diese Befunde sind im Hinblick auf die nicht geklärte Pathogenese der septischen Kardiomyopathie von Interesse, denn sie verdeutlichen das komplexe und redundante Zusammenspiel verschiedener Toxin-aktivierter Mediatoren auf unterschiedlicher Ebene bei der Entstehung dieser Organkomplikation. Hierdurch wird zudem verständlich, warum klinische Therapieversuche der Vergangenheit, welche lediglich gegen einen spezifischen Mediator, meist TNF oder gegen ein Toxin, häufig LPS gerichtet waren, bisher ohne

durchgreifenden Erfolg blieben, da sie doch viele zusätzliche pathophysiologisch relevante Mediatoren oder Toxine des selben Sepsiserregers völlig unbeeinflusst lassen.

Der zweite interessante Aspekt der Arbeit besteht darin, dass die überragende Bedeutung bakterielle Toxine in der Pathogenese der Sepsis und ihrer Organkomplikationen unterstrichen wird. Die Befunde belegen, wie in einem infektiösen Fokus angesiedelte Sepsiserreger auch ohne eine klinisch fassbare Bakteriämie, nämlich durch eine „Toxinämie“, schwerwiegende Organfunktionsstörungen hervorrufen könnten. Diese Daten unterstreichen die Relevanz der etablierten Therapiebestandteile der Sepsis, der antibiotischen Therapie und der chirurgischen Sanierung eines infektiösen Fokus.

Auch wenn die gegen einen einzelnen Mediator gerichteten Therapiestrategien der Sepsis bislang vor allem enttäuschende Ergebnisse gebracht haben, bleiben inflammatorische und relevante vasoaktive Mediatorsysteme wie die der cyclischen Nucleotide und PDEs von großem Interesse, da durch deren pharmakologische Modulation auf einer „übergeordneten“ Ebene Einfluss auf die Entzündungskaskade genommen werden könnte.

Relevante klinische Beispiele für einen therapeutisch erfolgreichen Einsatz von PDE-Inhibitoren stellt die Therapie der pulmonalen Hypertonie dar. Hier kann durch Wirkung von Sildenafil ein klinisch signifikanter Effekt auf die pulmonale Vasokonstriktion ausgeübt werden. Auch wenn von einem theoretischen Standpunkt aus nach den vorliegenden Daten ein solcher Therapieansatz auch zur Therapie der septischen Kardiomyopathie von Nutzen sein könnte, wäre der klinische Einsatz von Sildenafil aufgrund der systemischen Nebenwirkungen nicht möglich.

Grundsätzlich zeigt die vorliegende Arbeit jedoch, dass die Modulation der PDE ein Potential zur Behandlung oder Prävention der septischen Kardiomyopathie haben könnte, so dass weiterführende Untersuchungen auf diesem Gebiet von großem Interesse sein können.

6 Zusammenfassung

6.1 Zusammenfassung

Verschiedene Mikroorganismen, wie Bakterien, Viren oder Pilze, können in einem Organismus eine lokalisierte Infektion hervorrufen. Kommt es bei ungenügender Immunantwort zu einer systemischen Entzündungsreaktion des Organismus, spricht man von Sepsis. Eine solche Reaktion kann durch Aussaat der Erreger selbst oder ihrer Toxine in die Blutbahn verursacht werden. Auch die Ausschwemmung bestimmter Bakterientoxine kann eine solche Reaktion hervorrufen. Trotz intensiver Forschung und verbesserter Therapiemöglichkeiten stellt die Mortalität bei der Sepsis weiterhin ein großes Problem der modernen Medizin dar. Im Rahmen des septischen Geschehens kommt es häufig zum septischen Schock als Ausdruck schwerwiegender kardiovaskulärer Veränderungen. Untersuchungen der letzten Jahre haben gezeigt, dass kardiale Funktionsstörungen, die Ausdruck einer so genannten septischen Kardiomyopathie sind, erheblich zu diesen Veränderungen beitragen. Wie in den letzten Jahren gezeigt werden konnte, kann eine Vielzahl bakterieller Toxine klinisch relevanter Sepsiserreger die Herzfunktion negativ beeinflussen. Pathogenetisch könnte die unphysiologische Toxin-abhängige Freisetzung kardiodepressiver Zytokine und vasoaktiver Mediatoren im Herzen ursächlich zur Entstehung der septischen Kardiomyopathie beitragen. Zyklische Nukleotide wie das cGMP, der second messenger des Vasodilatators NO, spielen bei der Regulation der koronaren Vasomotorik eine große Rolle. Die Wirkdauer von cGMP wird durch die Aktivität von Phosphodiesterasen bestimmt, welche u.a. cGMP inaktivieren. Vor diesem Hintergrund wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, inwieweit sich die kardiale Dysfunktion in einem experimentellen Modell der septischen Kardiomyopathie durch spezifische Inhibition der PDE 5 modulieren lässt.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Bakterientoxine *Staphylococcus aureus* α -Toxin und LTA an isoliert perfundierten Rattenherzen eine kardiale Dysfunktion hervorrufen, welche den in der Sepsis auftretenden kardialen Veränderungen entsprechen könnten. Den Kern der Arbeit bildeten die Untersuchungen, mit denen belegt werden konnte, dass durch die spezifische Inhibition der PDE 5 durch sowohl Zaprinast als auch Sildenafil

die durch die Toxine hervorgerufenen Herzfunktionsstörungen abgemildert werden konnten. Entscheidend war hierbei, dass sowohl durch Zaprinast als auch Sildenafil spezifisch in die relevanten Pathomechanismen der Toxin-induzierten Herzschiidigung eingegriffen werden konnte. So konnte durch Inhibition der PDE 5 im Falle von α -Toxin die ursiichliche, unphysiologische α -Toxin-abhiiangige Bildung von TxA_2 abgeschwiiacht werden. Im Falle von LTA wurde in Anwesenheit der PDE 5-Inhibitoren die LTA-stimulierte Bildung von kardiodepressivem $\text{TNF-}\alpha$ abgeschwiiacht.

Diese Ergebnisse belegen, dass die Inhibitoren der PDE 5 am vorliegenden experimentellen Modell einen potentiellen kardioprotektiven Effekt ausiiuben kiihnten. Inwieweit diese Eigenschaften in der Therapie der septischen Kardiomyopathie genutzt werden kiihnten, muss Gegenstand kiihnftiger Untersuchungen sein.

6.2 Summary

Several microorganisms, like bacteria, viruses, and fungi can cause local infections within an organism. A systemic reaction of the organism due to an insufficient immune response is called sepsis. Such a reaction can be caused by the pathogenic microorganism itself or by its toxin(s), which are released into the bloodstream. Also the dissemination of certain parts of bacteria can be causative for a reaction like this. Despite intensive research and improved therapeutic options, the mortality of sepsis is still a major challenge of modern medicine. Within the framework of a septic event, a septic shock often appears as a result of serious cardiovascular alterations. Investigations of the last years have shown that cardiac dysfunction, as a sign of a so-called septic cardiomyopathy, contributes substantially to these alterations. As shown in the last years, a multitude of bacterial toxins of clinical relevant microorganisms can negatively affect the heart function. From the pathogenetic viewpoint, the nonphysiological toxin-dependent release of cardio-depressive cytokines and vasoactive mediators in the heart could contribute to the development of septic cardiomyopathy. Cyclic nucleotides like cGMP, a second messenger of NO involved in regulating smooth muscle tone, play a major role in modulating the coronary vasomotor function. NO is a potential vasodilator, whereby cGMP as a second messenger circulates this information. The effectiveness of cGMP is defined by the activity of phosphodiesterases, which inactivate

cGMP by hydrolysis. Against this background, the present study investigated to which extent the cardiac dysfunction can be modulated through specific inhibitors of PDE 5 in an experimental model of septic cardiomyopathy.

In the present study, it was shown that the bacterial toxins *Staphylococcus aureus* α -Toxin (α -Tox) and Lipoteichoic acid (LTA), respectively, produced a cardiac dysfunction in isolated perfused rat hearts, which is in accordance with the cardiac alterations during sepsis. The key finding of these investigations was that specific inhibition of PDE 5 by either Zaprinast or Sildenafil, attenuated toxin-induced heartdysfunction. It was crucial that both Zaprinast and Sildenafil interfered with the relevant pathomechanisms of the toxin-induced damage of the heart. In the case of α -Tox, the causative unphysiological α -Tox-dependent production of TxA₂ could be diminished. In the case of LTA, the LTA-stimulated production of cardiodepressive TNF- α was diminished in the presence of PDE 5-inhibitors.

These results confirm that the inhibition of PDE 5 exert a potential cardioprotective effect in the present experimental model. Whether these results can be used in the therapy of septic cardiomyopathy, has to be investigated in further studies.

7 Literaturverzeichnis

- [1] Weigand MA, Hörner C, Bardenheuer HJ, Bouchon A. The systemic inflammatory response syndrome. *Best Pract & Research Clinic Anaesthes* 2004;18 (3):455-475
- [2] Hotchkiss RS, Karl IE. The Pathophysiologie and Treatment of Sepsis. *N Eng J Med* 2003 Jan 9;348(2):138-150
- [3] Engel, C., Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study. *Intensive Care Med.* 2007 Apr; 33(4): 606-618
- [4] Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* 1992 Jun; 101(6):1644-1655
- [5] Schottmüller H., Wesen und Behandlung der Sepsis. *Verh Dtsch Ges Inn Med* 1914; 31, 257-280
- [6] Court O, Kumar As, Parrillo JE, Kumar An. Clinical review: Myocardial depression in sepsis and septic shock. *Crit Care* 2002, 6: 500-508
- [7] Parrillo JE, moderator. Septic shock in humans: advances in the understanding of pathogenesis, cardiovascular dysfunction and therapy. *Ann Intern Med* 1990; 113: 227-242
- [8] Parrillo JE. The cardiovascular pathophysiology of sepsis. *Ann Rev Med* 1989; 40: 469-485
- [9] Belcher E, Mitchell J, Evans T. Myocardial dysfunction in sepsis: no role for NO? *Heart* , 87: 505-509
- [10] Bone RC. Sepsis, the sepsis syndrome, multi-organ failure: a plea for comparable definitions. *Ann Int Med* 1991; 114: 332-333

- [11] Parker MM, Shelhamer JH, Natanson C, Alling DW, Parrillo JE. Serial cardiovascular variables in survivors and nonsurvivors of human septic shock: Heart rate as an early predictor of prognosis. *Crit Care Med* 1987; 15: 923-929
- [12] Groenevelt ABJ, Bronsveld LG, Thijs. Hemodynamic determinants of mortality in human septic shock. *Surgery* 1986; 90: 140-152
- [13] Schuster HP. Schlussfolgerungen, In: Werdan K. (ed.) Sepsis: Toxinwirkung, Herzschädigung, Quantifizierung, supportive Therapie mit Immunglobulinen. *Intensive med* 1989; 26: Suppl. 1: 152-153
- [14] Parker MM, Shelhamer JH, Bacherach SL, Green NV, Nantson C, et al. Profound but reversible myocardial depression in patients with septic shock. *Ann Int Med* 1984; 100: 483-490
- [15] Parker MM, Mc Carthy KE, Ognibene FP, Parrillo JE. Septic shock in humans produces similar patterns of left and right ventricular dysfunction and dilatation. *Clin Res* 1988; 36: 373A
- [16] Ellrodt AG, Riedinger MS, Kimchi A, Berman DS, Maddahi J, Swan HJC, Murata GH. Left ventricular performance in septic shock: Reversible segmental and global abnormalities. *Am Heart J* 1985; 110: 402-409
- [17] Ognibene FP, Parker MM, Nantson C, Shelhamer JH, Parrillo JE. Depressed left ventricular performance: response to volume infusion in patients with sepsis and septic shock. *Chest* 1988; 93: 903-910
- [18] Cunnion RE, Schaer GL, Parker MM, Natanson C, Parrillo JE. The coronary circulation in human septic shock. *Circulation* 1986; 73: 637-644
- [19] Dhainaut JF, Huyghebaert MF, Monsallier JF, Lefevre G, Dall'Ava-Santucci J, Brunet F, Villemant D, Carli A, Raichvarg D. Coronary hemodynamics and myocardial metabolism of lactate, free fatty acids, glucose and ketones in patients with septic shock. *Circulation* 1987; 75: 533-541
- [20] Natanson C, Fink MP, Ballantine HK, MacVittie TJ, Conclin JJ, Parrillo JE. Gram negative bacteria produces both severe systolic and diastolic cardiac dysfunction

- in a canine model that stimulates human septic shock. *J Clin Invest* 1988; 78: 259-270
- [21] Natanson C, Danner RL, Fink MP, Mac Vittie TJ, Walker RI, Conklin JJ, Parrillo JE. Cardiovascular performance with *E. coli* challenges in a canine model of human sepsis. *Am J Physiol* 1988; 254: H558-H569
- [22] Stahl TJ, Alden PB, Ring WS, Madoff RC, Cerra FB. Sepsis induced diastolic dysfunction in chronic canine peritonitis. *Am J Physiol* 1990; 258: H625-H633
- [23] McDonough KH, Lang CH, Spitzer JT. Depressed function of isolated hearts from hyperdynamic septic rats. *Circ Shock* 1984; 12: 241-251
- [24] McDonough KH, Lang CH, Spitzer JT. The effect of hyperdynamic sepsis on myocardial performance. *Circ Shock* 1985; 15: 247-259
- [25] Lee K, van der See H, Dziuban SW Jr, Luhmann K, Goldfarb RD. Left ventricular function during chronic endotoxemia in swine. *Am J Physiol* 1988; 254: H324-H330
- [26] Goldfarb RD, Lee KJ, Andrejuk T, Dziuban SW Jr. End-systolic elastance as an evaluation of myocardial function in shock. *Circ shock* 1990; 30: 15-26
- [27] Wiggers CJ. Myocardial depression in shock. A survey of cardiodynamic studies. *Am Heart J* 1947; 33: 633-650
- [28] Wangenstein SL, Geissenger WT, Lovett WL, et al. Relation between splanchnic blood flow and a myocardial depressant factor in endotoxin shock. *Surgery* 1971; 69: 410-418
- [29] Parrillo JE, Burch C, Shelhamer JH, et al. A circulating myocardial depressant substance in humans with septic shock. Septic shock patients with a reduced ejection fraction have a circulating factor that depresses in vitro myocardial cell performances. *J Clin invest* 1985; 76: 1539-1553
- [30] Krishnagopalan S, Kumar As, Parrillo JE, Kumar An. Myocardial dysfunction in the patient with sepsis. *Curr Opin Crit Care* 2002; 8: 376-388

- [31] Cunnion RE, Parrillo JE. Myocardial dysfunction in sepsis. Recent insights. *Chest* 1989; 95: 941-945
- [32] Kumar A, Thota V, Dee L, Olson J, Uretz E, Parrillo JE. Tumor necrosis factor α and Interleukin 1β are responsible for in vitro myocardial depression induced by human septic shock serum. *J Exp Med* 1996; 183: 949-958
- [33] Cain BS, Meldrum DR, Dinarello CA, Meng X, Joo KS, Banerjee A, Harkan AH. Tumor necrosis factor- α and Interleukin- 1β synergistically depress human myocardial function. *Crit Care Med* 1999; 27: 1309-1318
- [34] Yokoyama T, Vaca L, Rossen RD, Durante W, Hazarika P, Mann DL. Cellular basis for the negative inotropic effects of tumor necrosis factor- α in the adult mammalian cardiac myocyte. *J Clin Invest* 1993; 92: 2303-231
- [35] Oral H, Dorn GW, Mann DL. Sphingosine mediates the immediate negative inotropic effects of tumor necrosis factor- α in the adult mammalian cardiac myocyte. *J Biol Chem* 1997; 272: 4836-4842
- [36] Grandel U, Fink L, Blum A, Heep M, Buerke M, Kraemer HJ, Mayer K, Bohle RM, Seeger W, Grimminger F, Sibelius U. Endotoxin-induced myocardial necrosis factor-alpha synthesis depresses contractility of isolated rat hearts: evidence for a role of sphingosin and cyclooxygenase-2-derived thromboxane production. *Circulation* 2000; 102: 2758-2764
- [37] Abi-Gerges N, Fischmeister R, Mery PF. G-protein-mediated inhibitory effect of a nitric oxide donor on the L-type Ca^{2+} current in rat ventricular myocytes. *J Physiol* 2001; 531: 117-130
- [38] Schulz R, Nava E, Moncada S. Induction and potential biological relevance of a Ca^{2+} -independent nitric oxide synthase in the myocardium. *Br J Pharmacol* 1992; 105: 575-580
- [39] Stein B, Frank P, Schmitz W, Scholz H, Thoenes M. Endotoxin and Cytokines induce direct cardiodepressive effects in mammalian cardiomyocytes via induction of nitric oxide synthase. *J Mol Cell Cardiol* 1996; 28: 1631-1639

- [40] Vincent JL, Bakker J, Marecaux G, Schandene L, Kahn RJ, Dupont E. Administration of anti-TNF antibody improves left ventricular function in septic shock patients: results of a pilot study. *Chest* 1992; 101: 810-815
- [41] Fisher CJ Jr, Dhainhaut JF, Opal SM, Pribble JP, Balk RA, Slotman GJ, Iberti TJ, Rackow EC, Shapiro MJ, Greenman RL, Reines HD, Shelly MP, Thompson BW, La Breque JF, Catalano MA, Knaus WA, Saddoff JC. Recombinant human IL-1 antagonist in the treatment with the patients with the sepsis syndrome: results from a randomized double blind placebo controlled trial. *JAMA* 1994; 271: 1836-1843
- [42] Walmrath D, Pilch J, Scharmann M, Grimminger F, Seeger W. Severe VA/Q mismatch in perfused lungs evoked by sequential challenge with endotoxin and *E. coli* hemolysin. *J Appl Physiol* 1994; 76:1020-1030
- [43] Mayer K, Temmesfeld-Wollbrück B, Friedland A, Olschewski H, Reich M, Seeger W, Grimminger F. Severe microcirculatory abnormalities elicited by *E. coli* hemolysin in the rabbit ileum mucosa. *Am J Respi Crit Care med* 1999; 160: 1171-1178
- [44] Unger, L.S., H.M. Cryer, R.N. Garrison. Differential response of the microvasculature in the liver during bacteremia. *Circ Shock* 1989; 29: 335-344
- [45] Cryer HG, Garrison RN, Harris PD, Greenwald BH, Alsip NL. Prostaglandins mediate skeletal muscle arteriole dilation in hyperdynamic bacteremia. *Am J Physiol* 1990; 259: H 728-H 734
- [46] Cronenwett JL, Lindenauer SM. Direct measurement of arteriovenous anastomotic blood flow in the septic canine hindlimb. *Surgery* 1979; 85: 275-282
- [47] Groeneveld AB, van Lambalgenet AA, van den Bos GC, Bronsveld W, Nauta JJ, Thijs LG. Maldistribution of heterogeneous coronary blood flow during canine endotoxin shock. *Cardiovasc Res* 1991; 25: 80-88
- [48] Fernandes Jr CJ, Akamine N, Knobel E. Cardiac troponin: a new serum marker of myocardial injury in sepsis. *Intensive Care Med* 1999; 25:1165-1168

- [49] Bloos FM, Morisaki HM, Neal AM, Martin CM, Ellis CG, Sibbald WJ, Pitt ML. Sepsis depresses the metabolic oxygen reserve of the coronary circulation in mature sheep. *Am J Respir Crit Care Med* (1996) 153:1577-84
- [50] Avontuur J.A., Bruining H.A., Ince C. Inhibition of nitric oxide synthesis causes myocardial ischemia in endotoxemic rats. *Circ Res* 1995; 76:418-425
- [51] Mayer K, Fegbeutel C, Hattar K, Sibelius U, Kramer HJ, Heuer KU, Temmesfeld-Wollbruck B, Gokorsch S, Grimminger F, Seeger W. w-3 vs w-6 lipid emulions exert differential influence on neutrophils in septic shock patients: impact on plaxma fatty acids and lipid mediator generation. *Intensive Care Med* 2000; 29: 1472-1481
- [52] Bulger EM, Maier RV. Lipid mediators in the pathophysiology of critical illness. *Crit Care Med* 2000; 28: N27-N36
- [53] Schulz R, Moncada S. Induction and potential biological relevance of a Ca^{2+} -independent nitric oxide synthase in the myocardium. *Br J Pharmacol* 1992; 105:575-580
- [54] Kelm M, Schrader J. Control of coronary vascular tone by nitric oxide. *Circ Resc* 1990; 66: 1561-1575
- [55] Nathan C. Nitric oxide as an secretory product of mammalian cells. *FASEB J* 1992; 6: 3051-3064
- [56] Lincoln TM, Cornwell TL. Towards an understanding of the mechanism of action of cyclic AMP and cyclic GMP in smooth muscle relaxation. *Blood Vessel* 1991; 28: 129-137
- [57] Marin J, Rodriguez-Martinez MA. Role of vascular nitric oxide in physiological and pathological conditions. *Pharmacol Ther* 1997; 75 (2): 111-134
- [58] Hare JM, Keaney JF, Balligand JL, et al. Role of nitric oxide in parasympathetic modulation of beta-adrenergic myocardial contractility in normal dogs. *J Clin Invest* 1995; 95: 360-366

- [59] Balligant JL, Kobzik L, Han X, et al. Nitric oxide-dependent parasympathetic signaling is due to activation of constitutive endothelial (type III) nitric oxide synthase in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 1995; 270:4582-14586
- [60] Brady AJ, Warren JB, Poole-Wilson PA, et al. Nitric oxide attenuates cardiac myocyte contraction. *Am J Physiol* 1993; 265: H176-182
- [61] Radomski MW, Palmer RMJ, Moncada S. Glucocorticoids inhibit the expression of an inducible, but not the constitutive, nitric oxide synthase in vascular endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 10043-10047
- [62] Busse R, Mulsch A. Induction of nitric oxide synthase by cytokines in vascular smooth muscle cells. *FEBS-Lett* 1990; 275: 87-90
- [63] Wagner DA, Young VR, Tannenbaum SR. Mammalian nitrate biosynthesis: Incorporation of $^{15}\text{NH}_3$ into nitrate is enhanced by endotoxin treatment. *Natl Acad Sci USA* 1983; 80: 4518-4521
- [64] Ochoa JB, Udekwu AO, Billiar TR, et al. Nitric oxide levels in patients after trauma and during sepsis. *Ann Surg* 1991; 214: 621-626
- [65] Rosenberg RB, Broner CW, O'Dorisio MS. Modulation of cyclic guanosin monophosphate production during early *E. coli* septic shock. *Biochem Med Metal Biol* 1994; 51: 149-155
- [66] Schuller F, Flemming I, Stoclet JC et al. Effect of endotoxin on circulating cyclic GMP in the rat. *Eur J Pharmacol* 1992; 212: 93-96
- [67] Schneider F, Lutun P, Couchot A, et al. Plasma cyclic guanosin 3'-5' monophosphate concentrations and low vascular resistance in human septic shock. *Intens Care Med* 1993; 19: 99-104
- [68] Kumar A, Brar R, Wang P, Dee L, Skorupa G, Khadour F, Schulz R, Parrillo JE. Role of nitric oxide and cGMP in human septic serum-induced depression of cardiac myocyte contractility. *Am J Physiol* 1999; 276: R265-276
- [69] Finkel MS, Oddis CV, Jacob TC, Watkins SC, Hattler BG, Simmons RL. Negative inotropic effects of cytokines on the heart mediated by nitric oxide. *Science* 1992; 257: 387-389

- [70] Swith WL, Garavito RM, DeWitt DL. Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. *J Biol Chem* 1996; 271:33157-33160
- [71] Liu SF, Newton R, Evans TW, Barnes PJ. Differential regulation of cyclooxygenase-1 and cyclo-oxygenase-2 gene expression by lipopolysaccharide treatment in vivo in the rat. *Clin Sci (Lond)* 1996; 90:301-306
- [72] Wong SC, Fukuchi M, Melnyk P, Rodger I, Giaid A. Induction of cyclooxygenase-2 and activation of nuclear factor-kappa B in myocardium of patients with congestive heart failure. *Circulation* 1998; 98:100-103
- [73] Capdevila JH, Falck JR. Biochemical and molecular properties of the cytochrome P450 arachidonic acid monooxygenases. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2002; 68-69: 325-344
- [74] Capdevila JH, Falck JR, Estabrook RW. Cytochrome P450 and the arachidonate cascade. *Faseb J* 1992; 6: 731-736
- [75] Seeger, W, Walter H, Suttorp N, Muhly M, Bhakdi S. Thromboxane-mediated hypertension and vascular leakage evoked by low doses of *Escherichia coli* haemolysin in rabbit lungs. *J. Clin. Invest.* 1989; 84: 220-227
- [76] Sibelius, U, Grandel U, Buerke M, Mueller D, Kiss L, Kraemer HJ, Braun-Dullaeus R, Haberbosch W, Seeger W, Grimminger F. Staphylococcal alpha-toxin provokes coronary vasoconstriction and loss in myocardial contractility in perfused rat hearts: role of thromboxane generation. *Circulation*. 2000; 101 (1): 78-85
- [77] Seeger, W, Wolf H, Stahler G, Neuhof H, Roka L. Increased pulmonary vascular resistance and permeability due to arachidonate metabolism in isolated rabbit lungs. *Prostaglandins* 1982; 23 (82): 157-73
- [78] Petrak, RA, Balk RA, Bone RC. Prostaglandins, cyclo-oxygenase inhibitors, and thromboxane synthetase inhibitors in the pathogenesis of multiple systems organ failure. *Crit Care Clin* 1989; 5: 303-14
- [79] Bernard, GR, Reines HD, Halushka PV, Higgins SB, Metz CA., Swindell BB, Wright PE, Watts FL, Vrabanac JJ. Prostacyclin and thromboxane A₂ formation

- is increased in human sepsis syndrome. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1991; 144: 1095-1101
- [80] Fujioka K, Sugi K, Isago T, Flynn JT, Traber LD, Herndon DN, Traber DL. Thromboxane synthase inhibition and cardiopulmonary function during endotoxemia in sheep. *J Appl Phys* 1991; 71:1376-1381
- [81] Müller-Werdan U, Schuster HP. Abriss der Pathophysiologie als Grundlage der Therapie. In Sepsis und MODS, K Werdan, HP Schuster, U Müller-Werdan (eds). *Berlin, Springer* 2005, pp.34-44
- [82] Thien FCK, Walters EH, Eicosanoids and asthma -an update. Prostaglandins *Leukot. Essent. Fatty Acids* 1995; 52: 271–288
- [83] Bhattacharjee P, Boughton-Smith NK, Follenfant RL, et al., The effects of a novel series of selective inhibitors of arachidonate 5-lipoxygenase on anaphylactic and inflammatory responses, *Ann. NY Acad. Sci.* 1998; 542: 307–320
- [84] Joris I, Majno G, Corey EJ, Lewis RA. The mechanism of vascular leakage induced by leukotriene E₄. *Am. J. Pathol.* 1987; 26: 19-24
- [85] Maclouf, J, Sala A, Rossoni G, Berti F, Muller-Peddinghaus R, Folco G. Consequences of transcellular biosynthesis of leukotriene C₄ on organ function. *Haemostasis.* 1996; 26 Suppl 4: 28-36
- [86] Sala A, Rossoni G, Buccellati C, Berti F, Folco G, Maclouf J. Formation of sulphidopeptide-leukotriene by cell-cell interaction causes coronary vasoconstriction in isolated, cell-perfused heart of rabbit. *Br J Pharmacol* 1993; 110: 1206-1212
- [87] Sibelius U, Grandel U, Buerke M, Kiss L, Klingenberg P, Heep M, Bournelis E, Seeger W, Grimminger F. Leukotriene mediated coronary vasoconstriction and loss in myocardial contractility evoked by low doses of *Escherichia coli* hemolysin in perfused rat hearts. *Crit Care Med* 2003; 31: 683-688
- [88] Pilz G, Mc Ginn P, Boestegers P, Kaab S, Weidenhofer S, Werdan K: *Pseudomonas* sepsis does not cause more severe cardiovascular dysfunction in patients than non-*Pseudomonas* sepsis. *Cir. Shock* 1994; 42: 174-182

- [89] Natanson C., Danner RL, Elin RJ, Hosseine JM, Peart KW, Banks SM, Mac Vittie TJ, Walker RI, Parillo JE: Role of endotoxemia in cardiovascular dysfunction and mortality. *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* challenges in a canine model of human septic shock. *J Clin Invest* 1989; 83: 243-251
- [90] Reithman C, Werdan K. Noradrenalin-induced desensitization in cultured heart cells as a model for the defects of the adenylate cyclase system in severe heart failure. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1989; 339: 138-144
- [91] Reithman C, Gierschik P, Müller U, Werdan K, Jakobs KH. Pseudomonas exotoxin a prevents β -adrenoreceptor-induced upregulation of Gi protein α -subunits and adenylyl cyclase desensitization in rat heart muscle cells. *Mol Pharmacol* 1990; 37: 631-638
- [92] Grimminger F, Sibelius U, Bhakdi S, Suttrop N, Seeger W. *Escherichia coli* hemolysin is a potent inducer of phosphoinositide hydrolysis and related metabolic responses in human neutrophils. *J Clin Invest* 1991; 88: 1531-1539
- [93] Bhakdi S, Martin E. Superoxide generation by human neutrophils induced by low doses of *Escherichia coli* hemolysin. *Infect Immun* 1991; 107: 147-223
- [94] Thompson A, Halbert SP, Smith U. The toxicity of streptolysin O for beating mammalian heart cells in tissue culture. *J Exp Med* 1970; 131: 745-763
- [95] Füssle R, Bhakdi S, Sziegoleit A, Trantum-Jensen J, Kranz, T., Wellensiek HL. On the Mechanism of membrane damage by *S. aureus* α -toxin. *J Cell Biol* 1981; 91: 83-94
- [96] Hildebrand A, Pohl M, Bhakdi S. *Staphylococcus aureus* α -Toxin. Dual mechanism of binding to target cells. *J Biol Chem* 1991; 26: 17195-17200
- [97] Valeva A., Pongs J, Bhakdi S, Palmer M. Staphylococcal alpha-toxin: the role of the N-terminus in formation of the heptameric pore - a fluorescence study. *Biochim. Biophys Acta* 1997; 1325 (2): 281-286
- [98] Walker B, Krishnasastri M, Zorn L, Bayley H. Assembly of the oligomeric membrane pore formed by staphylococcal alpha-hemolysin examined by truncation mutagenesis. *J Biol Chem* 1992; 267: 21782-21786

- [99] Song L, Hobaugh MR, Shoustak C, Cheley S, Bayley H. Subunit Structure of staphylococcal alpha hemolysin, a heptameric transmembrane pore. *Science* 1996; 274: 1859-1866
- [100] Bhakdi S, Tralum-Jensen J. Mechanism of complement cytolysis and the concept of channel-forming proteins. *Philos Trans R Soc London Ser* 1984; B 306: 311-324
- [101] Bhakdi S, Tralum-Jensen J. Damage to mammalian cells by proteins that form transmembrane pores. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1987; 107: 147-223
- [102] Bhakdi S, Traum-Jensen J. Damage to cell membranes by pore-forming bacterial cytolysins. *Pro Allergy* 1988; 40: 1-43
- [103] Bhakdi S, Tralum-Jensen J. Alpha-Toxin of *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Rev* 1991; 55 (4): 733-751
- [104] Grimminger F, Rose F, Sibelius U, Meinhardt M, Pötzsch B, Spriestersbach R, Bhakdi S, Suttorp N, Seeger W. Human endothelial cell activation and mediator release in response to the bacterial exotoxins *Escherichia coli* hemolysin and staphylococcal alpha-toxin. *J Immunol* 1997; 159: 1909-1916
- [105] Seeger W, Bauer M, Bhakdi S. Staphylococcal alpha-toxin elicits hypertension in isolated rabbit lungs. Evidence for thromboxane formation and the role of extracellular calcium. *J Clin Invest* 1984; 74 (3): 849-858
- [106] Seeger W, Birkemeyer RG, Ermert L, Suttorp N, Bhakdi S, Duncker HR. Staphylococcal alpha-toxin induced vascular leakage in rabbit lungs. *Lab Invest* 1990; 63: 341-349
- [107] Harshmann S, Lefferts PL, Snapper JR. Staphylococcal alpha-toxin: a study with chronically instrumented awake sheep. *Infect Immun* 1992; 60:3489 –3496
- [108] Haeffner-Cavallion N, Carreno MP, Aussel, L, Caroff M. Molecular aspects of endotoxins relevant to their biological function. *Nephrol Dia Transplant* 14998; 14: 853-860
- [109] Grandel U, Grimminger F. Endothelial responses to bacterial toxins in sepsis. *Crit Rev Immunol* 2003; 23: 267-299

- [110] Rubin LJ, Keller RS, Parker JL, Adams HR. Contractile dysfunction of ventricular myocytes isolated from endotoxemic guinea pigs. *Shock* 1994; 2: 113-120
- [111] Suffredini AF, Fromm RE, Parker MM, Brenner M, Kovacs JA, Wesley RA, Parrillo JE. The cardiovascular response of normal humans to the administration of endotoxin. *N Engl J Med* 1989; 321: 280-287
- [112] Hurley JC. Endotoxemia: Methods of detection and clinical correlations. *Clin Microbiol Rev* 1995; 8: 268-292
- [113] Casey LC, Balk RA, Bone RC. Plasma Cytokine and endotoxin levels correlate with survival in patients with the sepsos syndrome. *Ann Intern Med* 1993; 119: 771-778
- [114] Bone RC. Gram-positive organisms and sepsis. *Arch Intern Med* 1994; 154: 26-34
- [115] Wang JE, Dahle MK, McDonald M, Foster SJ, Aasen AO, Thiemermann C. Peptidoglycan and lipoteichoic acid in gram-positive bacterial sepsis: receptors, signal transduction, biological effects, and synergism. *Shock* 2003; 20 (5): 402-414
- [116] Morath S, Stadelmaier A, Geyer A, Schmidt RR, Hartung T. Synthetic lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus* is a potent stimulus of cytokine release. *J Exp Med* 2002; 195:1635-1640
- [117] Bhakdi S, Klonisch T, Nuber P, Fischer W. Stimulation of monokine production by lipoteichoic acids. *Infect Immun* 1991; 59: 4614–4620
- [118] Morath S, Geyer A, Hartung T. Structure-function relationship of cytokine induction by lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus*. *J Exp Med* 2001; 193: 393–397
- [119] Kawamura N, Imanishi N, Koike H, Nakahara H, Phillips L, Morooka S. Lipoteichoic acid-induced neutrophil adhesion via E-selectin to human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 217: 1208 –1215

- [120] Kengatharan KM, de Kimpe S, Robson C, Foster SJ, Thiernemann C. Mechanism of gram-positive shock: identification of peptidoglycan and lipoteichoic acid moieties essential in the induction of nitric oxide synthase, shock, and multiple organ failure. *J Exp Med* 1998; 188 (2): 305-15
- [121] De Kimpe S, Kengatharan M, Thiernemann C, Vane JR. The cell wall components peptidoglycan and lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus* act in synergy to cause shock and multiple organ failure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 10359 –10363
- [122] Kengatharan KM, de Kimpe SJ, Thiernemann C. Role of nitric oxide in the circulatory failure and organ injury in a rodent model of gram-positive shock. *Br J Pharmacol* 1996; 119 (7): 1411-21
- [123] De Kimpe SJ, Hunter ML, Bryant CE, Thiernemann C, Vane JR. Delayed circulatory failure due to the induction of nitric oxide synthase by lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus* in anaesthetized rats. *Br J Pharmacol* 1995; 114(6): 1317-1323
- [124] Tsuneyoshi I, Kanmura Y, Yoshimura N. Lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus* depresses contractile function of human arteries in vitro due to the induction of nitric oxide synthase. *Anesth Analg* 1996; 82 (5): 948-53
- [125] Grandel U, Hopf M, Buerke M, Hattar K, Heep M, Fink L, Bohle RM, Morath S, Hartung T, Pullamsetti S, Schermuly RT, Seeger W, Grimminger F, Sibelius U. Mechanisms of cardiac depression caused by lipoteichoic acids from *Staphylococcus aureus* in isolated rat hearts. *Circulation* 2005; 112 (5): 691-698
- [126] Cleveland MG, Gorham JD, Murphy TL, Tuomanen E, Murphy KM. Lipoteichoic acid preparations of gram-positive bacteria induce interleukin-12 through a CD14-dependent pathway. *Infect Immun* 1996; 64: 1906 –1912
- [127] Hattori Y, Kasai K, Akimoto K, Thiernemann C. Induction of NO synthesis by lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus* in J774 macrophages: involvement of a CD14-dependent pathway. *Biochem Biophys Res Comm* 1997; 233: 375–379

- [128] Ellingsen E, Morath S, Flo T, Schromm A, Hartung T, Thiernemann C, Espevik T, Golenbock D, Foster D, Solberg R, Aasen A, Wang J. Induction of cytokine production in human T cells and monocytes by highly purified lipoteichoic acid: involvement of Toll-like receptors and CD14. *Med Sci Monit* 2002; 8: 149-156
- [129] Beavo JA, Conti M, Heasley RJ. Multiple cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Mol Pharmacol* 1994; 46: 399-405
- [130] Conti M, Jin SC, Monaco L, Repaske DR, Swinnen JV. Hormonal regulation of cyclic nucleotide phosphodiesterases *Endocrine Rev* 1991; 12: 218-234
- [131] Sutherland EW, Rall TW. Fractionation and characterization of a cyclic adenosine ribonucleotide formed by tissue particles. *J Biol Chem* 1958; 232: 1077-1091
- [132] Butcher F, Sutherland EW. Adenosine 3',5'-phosphate in biological materials. *J Biol Chem* 1962; 237: 1244-1250
- [133] Francis SH, Turko IV, Corbin J. D. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: relating structure and function. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 2001; 65: 1-52
- [134] Wheeler MA, Ayyagari RR, Wheeler GL, Weiss RM. Regulation of cyclic nucleotides in the urinary tract, *J Smooth Muscle Res* 2005; 41: 1-21
- [135] Rybalkin SD, Yan C, Bornfeldt KE, Beavo JA. Cyclic GMP phosphodiesterases and regulation of smooth muscle function. *Circ Res* 2003; (22) 93: 280-291
- [136] Conti M, Beavo J. Biochemistry and Physiology of Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases: Essential Components in Cyclic Nucleotide Signaling. *Annu Rev Biochem* 2007; 76: 481-511
- [137] Bender AT, Beavo JA. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. *Pharmacol Rev* 2006; 58: 488-520
- [138] Mehats C, Andersen CB, Filopanti M, Jin SLC, Conti M. Cyclic nucleotide phosphodiesterases and their role in endocrine cell signalling. *TRENDS in Endocrinology & Metabolism* 2002; 13: 29-35

- [139] Coquil JF, Franks DJ, Wells JN, Dupuis M, Hamet P. Characteristics of a new binding protein distinct from the kinase for guanosine 3'-5'-monophosphate in rat platelets. *Biochim Biophys Acta* 1980; 631: 148–165
- [140] Francis SH, Lincoln TM, Corbin JD. Characterization of a novel cGMP binding protein from rat lung. *J Biol Chem* 1980; 255: 620–626
- [141] Lin CS. Tissue expression, distribution and regulation of PDE 5. *Int J Impot Res* 2004; 16 (1): 8-10
- [142] Kotera J, Fujishige K, Imai Y, Kawai E, Michibata H, Akatsuka H, Yanaka N, and Omori K. Genomic origin and transcriptional regulation of two variants of cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterases. *Eur J Biochem* 1999; 262: 866–873
- [143] Senzaki H, Smith CJ, Juang GJ, Isoda T, Mayer SP, Ohler A, Paolocci N, Tomaselli GF, Hare JM, Kass DA. Cardiac phosphodiesterase 5 (cGMPspecific) modulates β -adrenergic signaling *in vivo* and is down-regulated in heart failure. *FASEB J* 2001; 15:1718–1726
- [144] Pokreisz P, Vandenwijngear S, Bito V, Van den Berg A, Lenaerts I, Busch C, Marsboom G, Gheysens O, Vermeersch P, Biesmanns L, Liu X, Gillijns H, Pellens M, Van Lommel A, Buys E, Schoonjans L, Vanhaecke J, Verbeken E, Sipido K, Herijgers P, Bloch KD, Janssen P. Ventricular Phosphodiesterase-5 Expression is increased in Parients with Advanced Heart Failure and Cuntributes to Adversed Ventricular Remodeling after Myocardial Infarction in mice. *Circulation* 2009; 119: 408-416
- [145] Rybalkin SD, Rybalkina IG, Shimizu-Albergine M, Tang XB, and Beavo JA. PDE 5 is converted to an activated state upon cGMP binding to the GAF A domain. *EMBO (Eur Mol Biol Organ) J* 2003; 22: 469–478
- [146] Lin CS, Chow S, Lau A, Tu R, Lue TF. Human PDE 5A gene encodes three PDE 5 isoforms from two alternate promoters. *Int J Impot Res* 2002; 14: 15-24
- [147] Corbin, JD, Francis SH, Webb DJ. Phosphodiesterase type 5 as a pharmacologic target in erectile dysfunction. *Urology* 2002; 60: 4-11

- [148] Corbin JD, Francis SH. Cyclic GMP phosphodiesterase-5: target of Sildenafil. *J Biol Chem* 1999; 274: 13729-13732
- [149] Boswell-Smith V, Spina D, Page CP. Phosphodiesterase inhibitors. *British Journal of Pharmacology* 2006; 147: 252-257
- [150] Rybalkin SD, Yan C, Bornfeldt KE, Beavo JA. Cyclic GMP phosphodiesterases and regulation of smooth muscle function. *Circ Res* 2003; 93: 280-291
- [151] Menniti FS, Faraci WS, Schmidt CJ. Phosphodiesterases in the CNS: targets for drug development. *Nat Rev Drug Discov* 2006; 5: 660-70
- [152] Bender AT, Beavo JA. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. *Pharmacol Re.* 2006; 58: 488-520
- [153] Lepore JJ, Maroo A, Bigatello LM, Dec GW, Zapol WM, Bloch KD, Semigran MJ. Hemodynamic effects of sildenafil in patients with congestive heart failure and pulmonary hypertension: combined administration with inhaled nitric oxide. *Chest* 2005; 127: 1647– 1653
- [154] Cremers B, Böhm M. Non erectile dysfunction application of sildenafil. *Herz* 2003; 28: 325-233
- [155] Zhang X, Tack J, Janssens J, et. al. Effect of sildenafil, a phosphodiesterase-5-inhibitor, on oesophageal peristalsis and lower oesophageal sphincter function in cats. *Neurogastroenterol Motil* 2001; 13: 325-331
- [156] Ghofrani HA, Pepke-Zaba J, Barbera JA, Channick R, Keogh AM, Gomez-Sanchez MA, Kneussl M, Grimminger F. Nitric oxide pathway and phosphodiesterase inhibitors in pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2004; 43: 68S-72S
- [157] Schermuly RT, Inholte C, Ghofrani HA, Gall H, Weissmann N, Weidenbach N, Seeger W, Grimminger F: Lung vasodilatory response to inhaled iloprost in experimental pulmonary hypertension: amplification by different type phosphodiesterase inhibitors. *Respir Res.* 2005; 6: 76
- [158] Voswinckel R, Reichenberger F, Enke B, Kreckel A, Krick S, Gall H, Schermuly RT, Grimminger F, Rubin LJ, Olschewski H, Seeger W, Ghofrani HA. Acute

- effects of the combination of Sildenafil and inhaled treprostinil on haemodynamics and gas exchange in pulmonary hypertension. *Pulm Pharmacol Ther.* 2008; 21: 824-832. Epub 2008 Jul 9
- [159] Rocco PRM, Momesso DP, Figueira RC, et al. Therapeutic potential of a new phosphodiesterase inhibitor in acute lung injury. *Eur Respir J* 2003; 22: 20-27
- [160] Kass DA, Champion HC, Beavo JA. Phosphodiesterase type 5: expanding roles in cardiovascular regulation. *Circ Res* 2007; 101:1084-1095
- [161] Ockaili R, Salloum F, Hawkins J, et al. Sildenafil (Viagra) induces powerful cardioprotective effects via opening of mitochondrial K (ATP) channels in rabbits. *Am J Physiol* 2002; 283: H1263-H1269
- [162] Fisher PW, Salloum F, Das A, et al. Phosphodiesterase-5 inhibition with sildenafil attenuates cardiomyocyte apoptosis and left ventricular dysfunction in a chronic model of doxorubicin cardiotoxicity. *Circulation* 2005; 111: 1601-10
- [163] Lewis GD, Shah R, Shahzad K, et al. Sildenafil improves exercise capacity and quality of life in patients with systolic heart failure and secondary pulmonary hypertension. *Circulation* 2007; 115: 59-66
- [164] Langendorff, O., Untersuchungen am überlebenden Säugetierherzen. *Pflügers Archiv der gesamten Physiologie* 1985; 61: 291-332
- [165] Tavernir B, Garrigue D, Boulle C, et al. Myofilament Calcium Sensitivity is decreased in skinned cardiac fibres of endotoxin-treated rabbits. *Cardiovasc Res* 1998; 38: 472-479
- [166] Natanson C, Eichenholz PW, Danner RL, et al. Endotoxin and tumor necrosis factor challenges in dogs simulate the cardiovascular profile of human septic shock. *J Exp Med* 1989; 169: 823-832
- [167] Kumar A, Krieger A, Symeonides S, Kumar As, Parrillo JE. Myocardial Dysfunction in Septic Shock: Part II. Role of Cytokines and Nitric Oxide. *J of Cardiothoracic and Vasc Anaesthes* 2001; 15,(4): 485-511

- [168] Avontuur JA, Tutein Nolthenius RP, van Bodegom JW, Bruining HA. Prolonged inhibition of nitric oxide synthesis in severe septic shock: a clinical study. *Crit Care Med* 1998 Apr; 26(4): 660-667
- [169] Stahl GL, Lefer AM. Mechanisms of platelet-activating factor-induced cardiac depression in the isolated perfused rat heart. *Circ Shock* 1987; 23: 165-177
- [170] Hu WM, Choy PC, Man RY. Characterization of the coronary vascular response to platelet-activating factor in the isolated perfused heart. *Lipids* 1991; 26: 700-704
- [171] Montruccio G, Alloatti G, Camussi G. Role of platelet activating factor in cardiovascular pathophysiology. *Physiol Rev* 2000; 80: 1669-1699
- [172] Sharma AC, Motew SJ, Farias S, Alden KJ, Bosmann HB, Law WR, Ferguson JL. Sepsis alters myocardial and plasma concentration of endothelin and nitric oxide in rats. *J of Molecul and Cellul Cardiol* 1997; 29: 1469-1477
- [173] Roth DM, Lefer DJ, Hock CE, Lefer AM. Effects of peptide leukotrienes on cardiac dynamics in rat, cat und guinea pig hearts. *Am J Physiol* 1985; 249: H477-H484
- [174] Grandel U, Benkelmann R, Buerke M, et al. Free arachidonic versus eicosapentaenoic acid differentially influences the potency of bacterial exotoxins to provoke myocardial depression in isolated rat hearts. *Crit Care Med.* 2006; 34: 118-26
- [175] Avontuur JAM, Bruining HA, Ince C. Inhibition of nitric oxide synthesis causes myocardial ischemia in endotoxemic rats. *Circ Res.* 1995; 76: 418-425
- [176] Surks HK. cGMP-dependent protein kinase I and smooth muscle relaxation: a tale of two isoforms. *Circ Res.* 2007; 101:1078-80
- [177] Bhakdi S, Muhly M, Korom S, Hugo F. Release of interleukin-1 α associated with potent cytotoxic action of staphylococcal alpha-toxin on human monocytes. *Infect Immun* 1989; 57: 3512-3519

- [178] Suttorp N, Fuhrmann M, Tannert-Otto S, Grimminger F, Bhakdi S. Pore-forming bacterial toxins potently induce release of nitric oxide in porcine endothelial cells. *J Exp Med* 1993; 178: 337-341
- [179] Suttorp N, Seeger W, Dewein E, Bhakdi S, Roka L. Staphylococcal α -Toxin stimulates synthesis of prostacyclin by cultured endothelial cells from pig pulmonary arteries. *Am J Physiol* 1985; 248: C127-C135
- [180] Suttorp N, Hessz T, Seeger W, Wilke A, Koob R, Lutz F, Drenckhahn D. Bacterial exotoxins and endothelial permeability for water and albumin in vitro. *Am J Physiol* 1988; 255: C368-C376
- [181] Bhakdi S, Muhly M, Mannhardt U, Hugo F, Klapetteck K, Müller-Eckhard C, Roka L. Staphylococcal α -Toxin promotes blood coagulation via attack on human platelets. *J Exp Med* 1988; 168: 527-542
- [182] Corbin J, Rannel S, Neal D, Chang P, Grimes K, Beasley A, Francis S. Sildenafil citrate does not affect cardiac contractility in human or dog heart. *Curr Med Res Opin.* 2003; 19:747-752
- [183] Chalimoniuk M, Głowacka J, Zabiela A, Eckert A, Strosznajder JB. Nitric oxide alters arachidonic acid turnover in brain cortex synaptoneurosomes. *Neurochem Int.* 2006; 48 (1):1-8
- [184] Kelley-Hickie LP, Kinsella BT. Homologous desensitization of signalling by the alpha isoform of the human thromboxane A₂ receptor: a specific role for nitric oxide signalling. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1773(6): 970-989
- [185] Maurice DH, Palmer D, Tilley DG, Dunkerley HA, Netherton SJ, Raymond DR, Elbatarny HS, Jimmo SL. Cyclic nucleotide phosphodiesterase activity, expression, and targeting in cells of the cardiovascular system. *Mol Pharmacol* 2003; 64: 533-46
- [186] Grandel U, Sibelius U, Schrickel J, Schmidt D, Buerke M, Fink L, Bournelis E, Heep M, Mayer K, Bohle RM, Seeger W, Grimminger F. Biosynthesis of constitutive nitric oxide synthase-derived nitric oxide attenuates coronary

vasoconstriction and myocardial depression in a model of septic heart failure induced by *Staphylococcus aureus* alpha-toxin. Crit Care Med 2001; 29(1):1-7

- [187] Gurevitch J, Frolkis I, Yuhas Y, Paz Y, Matsa M, Mohr R, Yakirevich V. Tumor necrosis factor-alpha is related from isolated heart undergoing ischaemia reperfusion. J Am Coll Cardiol 1996; 28(1): 247-252

8 Erklärung

"Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der "Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten."

9 Danksagung

Ich möchte mich bei allen, die mich beim Erstellen dieser Arbeit unterstützt haben, sehr herzlich bedanken.

Herrn PD Dr. med. Ulf Sibelius danke ich für die Bereitstellung der apparativen und materiellen Ressourcen zur Durchführung des praktischen Teils dieser Arbeit in seiner Arbeitsgruppe.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. med. Ulrich Grandel für die Überlassung des interessanten Promotionsthemas sowie für seine fachlichen Ratschläge und die stete kompetente und unermüdliche Betreuung während der gesamten Entstehungszeit dieser Arbeit.

Des Weiteren möchte ich Frau Tina Heep meinen Dank aussprechen, die mich vor allem während der Durchführung der praktischen Tätigkeiten im Labor unterstützt hat. Ihr und meinen übrigen Laborkollegen danke ich für die vielen schönen Stunden bei der Arbeit im Labor.

Herrn Christian Jakob danke ich für die kreative Unterstützung bei der Erstellung der verschiedenen Abbildungen und Herrn Dr. Oliver P. Gautschi für die kritische Durchsicht der Arbeit.

Insbesondere möchte ich aber auch meinen Eltern danken, ohne deren Unterstützung die Absolvierung des Medizinstudiums und die Durchführung dieser Arbeit für mich wohl nicht möglich gewesen wäre.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-5720-6



9 783835 957206